

**Induzierte Hypomethylation**

**Beschleunigte Züchtung**

Zentromer-vermittelte Genomelimination

Cisgenese

**Methyltransferasen-Technik**

Zinkfinger-Nukleasen-Technik

Virus-induziertes Gen-Silencing

Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese

RNA-dirigierte DNA-Methylierung

**Pfropfen mit GVO**

Intragenese

**Meganukleasen-Technik**

Agroinfiltration

Reverse Breeding

**TALEN-Technik**

# Neue Pflanzenzuchtverfahren

Grundlagen für die Klärung offener Fragen bei der rechtlichen Regulierung neuer Pflanzenzuchtverfahren

Im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt

## **Neue Pflanzenzuchtverfahren – Grundlagen für die Klärung offener Fragen bei der rechtlichen Regulierung neuer Pflanzenzuchtverfahren.**

Bundesamt für Umwelt (BAFU), Sektion Biotechnologie, Bern  
Baudirektion des Kantons Zürich, Amt für Abfall, Wasser, Energie und Luft (AWEL), Sektion Biosicherheit (SBS)

### **Autor**

Benno Vogel, Baudirektion des Kantons Zürich, AWEL, SBS

### **Projektteam**

Daniel Fischer, AWEL, SBS  
Sara Restrepo-Vassalli, BAFU, Sektion Biotechnologie  
Albert Spielmann, BAFU, Sektion Biotechnologie  
Barbara Wiesendanger, AWEL, SBS  
Anne-Gabrielle Wust Saucy, BAFU, Sektion Biotechnologie

### **Titelblattfoto**

Rapsblüte von Friedrich Böhringer, Wikimedia

Der Bericht beruht auf Daten und Angaben aus Publikationen, die vor Juni 2012 veröffentlicht worden sind.

### **Korrespondenzadresse**

AWEL Amt für Abfall, Wasser, Energie und Luft, Abfallwirtschaft und Betriebe  
Sektion Biosicherheit (SBS)  
Postfach  
8090 Zürich  
Tel. 043 259 32 62  
Fax 043 259 39 80  
biosicherheit@bd.zh.ch  
<http://www.biosicherheit.zh.ch>

Zürich, Dezember 2012

## Zusammenfassung

**Ausgangslage:** Neu gezüchtete Pflanzensorten werden in der Schweiz unterschiedlich reguliert. Gelten sie als gentechnisch veränderte Organismen (GVO), fällt der Umgang mit ihnen unter den Geltungsbereich des Gentechnikgesetzes. Gelten sie nicht als GMO, sind das Landwirtschafts- und das Umweltschutzgesetz massgebend für den Umgang. Welche neu gezüchteten Sorten rechtlich als GMO gelten, ist 1990 definiert worden. Seither sind mehrere neue Pflanzenzuchtverfahren entwickelt worden, die gentechnische Methoden auf eine Weise nutzen, wie sie 1990 nicht absehbar war. Diese Verfahren sind für die Behörden eine Herausforderung, weil sie die Anwendung der geltenden GMO-Legaldefinition in Frage stellen und eine Rechtsunsicherheit bei der Regulierung der aus den Verfahren hervorgehenden Sorten schaffen.

**Zielsetzung:** Um die bestehende Rechtsunsicherheit zu beheben, braucht das federführende Bundesamt für Umwelt (BAFU) Grundlagen, anhand derer die Schritte zur Regulierung der neuen Verfahren eingeleitet werden können. Der vorliegende Bericht will diese Grundlagen liefern.

**20 neue Pflanzenzuchtverfahren:** Der Bericht identifiziert und beschreibt 20 Pflanzenzuchtverfahren, bei denen zu klären ist, wie die resultierenden Sorten rechtlich zu regulieren sind. Bei 11 dieser Verfahren ist zu erwarten, dass erste Sorten bis 2017 auf den weltweiten Markt kommen.

**Besonderheit der neuen Verfahren:** Die identifizierten Verfahren nutzen zwar gentechnische Methoden, können aber in Sorten oder Produkten resultieren, die frei von artfremden Genen sind. Aus 15 der neuen Verfahren können Sorten hervorgehen, die gänzlich frei von den während des Züchtungsprozesses eingeführten Genen sind.

**GVO-Klassierung:** Ob die aus den identifizierten Verfahren hervorgehenden Sorten als GMO zu klassieren sind, ist gegenwärtig unklar und wird für jedes Verfahren einzeln zu bestimmen sein.

**Kontrollmöglichkeiten:** Aus der Mehrheit der neuen Verfahren können Sorten hervorgehen, die sich mit den gängigen Nachweismethoden *nicht* als GMO erkennen liessen. Würden solche Sorten als GMO klassiert, fehlten Kontrollmöglichkeiten beim Vollzug der Gentechnikgesetzgebung.

**Wahlfreiheit:** Falls Sorten aus einem der neuen Verfahren *nicht* als GMO zu klassieren sind, wären sie *nicht* als GMO zu kennzeichnen. Damit bliebe die Anwendung der Gentechnik im Züchtungsprozess für KonsumentInnen und LandwirtInnen unsichtbar. Ob dies die Wahlfreiheit beeinträchtigen würde, ist gegenwärtig unklar und wäre abzuklären.

**Biosicherheit:** Wie die Biosicherheit der 20 neuen Verfahren im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren zu bewerten ist, bleibt zu beantworten. Der Bericht liefert für neun Verfahren eine Grundlage dazu. Hinsichtlich der Zulassung von Sorten aus den neuen Verfahren gilt es des Weiteren zu klären, ob die Prüfung der Biosicherheit einer strengen staatlichen Aufsicht obliegen soll oder der Eigenverantwortung der Hersteller und Importeure zu unterstellen ist.

**Internationale Handelsbeziehungen:** Hinsichtlich der Ein- und Ausfuhr von Pflanzenprodukten ist zu verfolgen, wie die Sorten aus den neuen Verfahren im Ausland reguliert werden. In der EU – dem wichtigsten Agrar-Handelspartner der Schweiz – sind noch keine Entscheidungen zur Regulierung getroffen worden. Die EU-Kommission hat jedoch Abklärungen dazu eingeleitet.

## Übersicht

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungen	VII
<hr/>	
Kurzfassung	IX
<hr/>	
Einleitung	1
<hr/>	
GVO-Legaldefinition	5
<hr/>	
Neue Pflanzenzuchtverfahren	
Agroinfiltration	7
Virus-induziertes Gen-Silencing	11
Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese	16
RNA-dirigierte DNA-Methylierung	22
Reverse Breeding	29
Beschleunigte Züchtung	35
Cisgenese	42
Intragenese	50
Pfropfen	57
Zinkfinger-Nukleasen-Technik	62
Weitere neue Verfahren	68
<hr/>	
Synopsis	75
<hr/>	
Regulatorische Aspekte	94
<hr/>	
Literatur	100

## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis .....	VI
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Abkürzungen .....	VII
<b>Kurzfassung .....</b>	<b>IX</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Ausgangslage.....	1
1.2 Zielsetzung .....	2
1.3 Behandelte Verfahren und Aspekte.....	2
1.3.1 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden .....	2
1.3.2 Aspekte der Biosicherheit .....	3
1.3.3 Aspekte der GVO-Klassierung .....	3
1.4 Aufbau des Berichts .....	3
<b>2. GVO-Legaldefintion .....</b>	<b>5</b>
<b>3. Neue Pflanzenzuchtverfahren .....</b>	<b>7</b>
3.1 Agroinfiltration .....	7
3.1.1 Beschreibung des Verfahrens .....	7
3.1.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht .....	8
3.1.3 Stand der Entwicklung .....	8
3.1.4 Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	9
3.1.5 Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	9
3.1.6 Sicherheitsaspekte.....	9
3.1.7 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden .....	10
3.1.8 GVO-Klassierung .....	10
3.1.8.1 Agroinfiltrierte Pflanzen .....	10
3.1.8.2 Stecklinge agroinfiltrierter Pflanzen.....	11
3.1.8.3 Samen agroinfiltrierter Pflanzen .....	11
3.1.8.4 Nachkommen von Pflanzen aus Samen agroinfiltrierter Pflanzen .....	11
3.2. Virus-induziertes Gen-Silencing (VIGS).....	11
3.2.1 Beschreibung des Verfahrens .....	11
3.2.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht .....	13
3.2.3 Stand der Entwicklung .....	13
3.2.4 Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	13
3.2.5 Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	13
3.2.6 Sicherheitsaspekte.....	14
3.2.7 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden .....	14
3.2.8 Aspekte der GVO-Klassierung .....	15
3.2.8.1 VIGS-behandelte Pflanzen.....	15
3.2.8.2 Samen VIGS-behandelter Pflanzen .....	15
3.2.8.3 Nachkommen von Pflanzen aus Samen VIGS-behandelter Pflanzen .....	16
3.3 Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese (ODM) .....	16
3.3.1 Beschreibung des Verfahrens .....	16
3.3.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht .....	18
3.3.3 Stand der Entwicklung .....	18

3.3.4 Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	18
3.3.5 Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	19
3.3.6 Sicherheitsaspekte.....	19
3.3.7 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden .....	20
3.3.8 Aspekte der GVO-Klassierung .....	20
3.3.8.1 ODM im Lichte von Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV.....	20
3.3.8.1 ODM im Lichte von Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV.....	21
3.4 RNA-dirigierte DNA-Methylierung (RdDM) .....	22
3.4.1 Beschreibung des Verfahrens .....	22
3.4.1.1 Induktion der RdDM mittels Transformation von IR-Konstruktion .....	23
3.4.1.2 Induktion der RdDM mittels transienter Transfektion .....	24
3.4.1.3 Induktion der RdDM mittels VIGS .....	24
3.4.1.4 Induktion der RdDM mittels Pfropfen.....	24
3.4.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht .....	24
3.4.3 Stand der Entwicklung .....	24
3.4.4 Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	25
3.4.5 Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	25
3.4.6 Sicherheitsaspekte.....	26
3.4.7 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden .....	27
3.4.8 Aspekte der GVO-Klassierung .....	27
3.4.8.1 Induktion der RdDM mittels Transformation.....	27
3.4.8.2 Induktion der RdDM mittels transienter Transfektion .....	28
3.4.8.3 Induktion der RdDM mittels VIGS .....	28
3.4.8.4 Induktion der RdDM mittels Pfropfen.....	29
3.5 Reverse Breeding (RB).....	29
3.5.1 Beschreibung der Technik.....	29
3.5.1.1 Unterdrückung der meiotischen Rekombination mittels Transformation .....	30
3.5.1.2 Unterdrückung der meiotischen Rekombination mittels VIGS.....	31
3.5.1.3 Unterdrückung der meiotischen Rekombination mittels Pfropfen .....	31
3.5.2 Anwendung in der Pflanzenzucht .....	31
3.5.3 Stand der Entwicklung .....	31
3.5.4 Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	32
3.5.5 Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	32
3.5.6 Sicherheitsaspekte.....	33
3.5.7 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden .....	33
3.5.8 Aspekte der GVO-Klassierung .....	34
3.6 Beschleunigte Züchtung .....	35
3.6.1 Beschreibung der Technik.....	35
3.6.1.1 Induktion der Blühverfrühung mittels Transformation .....	35
3.6.1.2 Induktion der Blühverfrühung mittels VIGS und VUGE .....	37
3.6.1.3 Induktion der Blühverfrühung mittels Pfropfen .....	37
3.6.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht .....	37
3.6.3 Stand der Entwicklung .....	37
3.6.4 Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	38
3.6.5 Beabsichtigte/unbeabsichtigte Wirkungen .....	38
3.6.6 Sicherheitsaspekte.....	38

3.6.7	Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden .....	40
3.6.8	Aspekte der GVO-Klassierung .....	40
3.6.8.1	Induktion der Blühverfrühung mittels Transformation .....	40
3.6.8.2	Induktion der Blühverfrühung mittels VIGS/VUGE .....	41
3.6.8.3	Induktion der Blühverfrühung mittels Pfropfen .....	42
3.7	Cisgenese .....	42
3.7.1	Beschreibung des Verfahrens .....	42
3.7.1.1	<i>Definitorische Aspekte</i> .....	44
3.7.2	Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht .....	45
3.7.3	Stand der Entwicklung .....	45
3.7.4	Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	45
3.7.5	Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	45
3.7.6	Sicherheitsaspekte.....	47
3.7.7	Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden .....	49
3.7.8	Aspekte der GVO-Klassierung .....	49
3.7.8.1	Cisgene Pflanzen im Lichte von Art. 3. Abs. 1 Bst. d FrSV .....	50
3.7.8.2	Anhang 1 Abs. 3 FrSV.....	50
3.8	Intragenese .....	50
3.8.1	Beschreibung des Verfahrens .....	50
3.8.1.1	P-DNA-Konzept.....	52
3.8.1.2	Konzept des intragenen Vektors .....	52
3.8.1.3	<i>Definitorische Aspekte</i> .....	52
3.8.2	Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht .....	53
3.8.3	Stand der Entwicklung .....	53
3.8.4	Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	53
3.8.5	Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	53
3.8.6	Sicherheitsaspekte.....	55
3.8.7	Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden .....	57
3.8.8	Aspekte der GVO-Klassierung .....	57
3.9	Pfropfen .....	57
3.9.1	Beschreibung des Verfahrens .....	58
3.9.2	Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	58
3.9.3	Stand der Entwicklung .....	59
3.9.4	Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	59
3.9.5	Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	60
3.9.6	Sicherheitsaspekte.....	60
3.9.7	Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden .....	61
3.9.8	Aspekte der GVO-Klassierung .....	61
3.9.8.1	Reiser .....	61
3.9.8.2	Stecklinge und Samen .....	62
3.10	Zinkfinger-Nukleasen-Technik .....	62
3.10.1	Beschreibung des Verfahrens .....	62
3.10.1.1	Transformation .....	63
3.10.1.2	Transiente Transfektion .....	63
3.10.1.3	VUGE .....	63
3.10.1.4	Agroinfiltration .....	65

3.10.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht .....	65
3.10.2.1 ZFN-1 .....	65
3.10.2.2 ZFN-2 .....	66
3.10.2.3 ZFN-3 .....	66
3.10.2.4 ZFN-4 .....	66
3.10.3 Stand der Entwicklung.....	66
3.10.4 Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	67
3.10.5 Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen .....	67
3.10.6 Sicherheitsaspekte.....	67
3.10.7 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden.....	67
3.10.8 Aspekte der GVO-Klassierung.....	68
3.11 Weitere neue Pflanzenzuchtverfahren .....	68
3.11.1 TALEN-Technik .....	68
3.11.1.1 Beschreibung des Verfahrens .....	68
3.11.1.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	69
3.11.1.3 Stand der Entwicklung .....	69
3.11.2 Meganukleasen-Technik.....	69
3.11.2.1 Beschreibung des Verfahrens .....	69
3.11.2.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	69
3.11.2.3 Stand der Entwicklung .....	69
3.11.3 Zentromer-vermittelte Genomelimination .....	70
3.11.3.1 Beschreibung des Verfahrens .....	70
3.11.3.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	70
3.11.3.3 Stand der Entwicklung .....	70
3.11.4 Induzierte Hypomethylation .....	71
3.11.4.1 Beschreibung des Verfahrens .....	71
3.11.4.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	72
3.11.4.3 Stand der Entwicklung .....	72
3.11.5 Gezielte Mutagenese mittels T-DNA .....	72
3.11.5.1 Beschreibung des Verfahrens .....	72
3.11.5.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	72
3.11.5.3 Stand der Entwicklung .....	72
3.11.6 Gezielte chemische Mutagenese .....	73
3.11.6.1 Beschreibung des Verfahrens .....	73
3.11.6.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	73
3.11.6.3 Stand der Entwicklung .....	73
3.11.7 <i>Seed Production Technology</i> .....	73
3.11.7.1 Beschreibung des Verfahrens .....	73
3.11.7.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	74
3.11.7.3 Stand der Entwicklung .....	74
3.11.8 Virus-unterstützte Genexpression .....	74
3.11.9 Transformation mit Wildtyp <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	74
3.11.10 Methyltransferasen-Technik .....	75
4. Synopsis von Kapitel 3.....	75
4.1 Kategorisierung der neuen Pflanzenzuchtverfahren .....	78
4.1.1 Kategorisierung nach der Art der Anwendung gentechnischer Methoden.....	79



4.1.1.1 Direkte Art der Anwendung gentechnischer Methoden .....	79
4.1.1.2 Indirekte Art der Anwendung gentechnischer Methoden .....	80
4.1.1.3 Kategorisierung nach Art der Anwendung gentechnischer Methoden.....	81
4.1.2 Kategorisierung nach dem Zweck der Nutzung gentechnischer Methoden .....	81
4.1.2.1 Erzeugung genetischer Variation.....	81
4.1.2.2 Erzeugung epigenetischer Variation .....	83
4.1.2.3 Unterstützung herkömmlicher Züchtungsverfahren.....	83
4.2 Stand der Entwicklung der neuen Verfahren .....	85
4.3 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden .....	85
4.4 Sicherheitsaspekte .....	88
4.4.1 Unbeabsichtigte Wirkungen .....	88
4.4.2 Nachweis der Abwesenheit extrazellulär eingeführter Sequenzen.....	90
4.5 Aspekte der GVO-Klassierung .....	91
4.5.1 Direkte Art der Anwendung gentechnischer Methoden .....	91
4.5.2 Indirekte Art der Anwendung gentechnischer Methoden.....	92
<b>5. Regulatorische Aspekte .....</b>	<b>94</b>
5.1 Biosicherheit .....	94
5.2 Schutz der Wahlfreiheit .....	95
5.3 Schutz der Produktion ohne gentechnisch veränderte Organismen .....	96
5.4 Achtung der Würde der Kreatur .....	96
5.5 Erkennung und Identifikation von Sorten aus den neuen Verfahren .....	97
5.6 Internationale Handelsbeziehungen .....	97
5.6.1 Abklärungen der EU-Kommission.....	98
5.7 Weitere Aspekte .....	99
5.7.1 Wiederholte Anwendung von Verfahren an derselben Pflanze .....	99
5.7.2 Überprüfung der Abwesenheit extrazellulär eingeführter DNA.....	99
<b>Literatur .....</b>	<b>100</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: 20 in der Literatur identifizierte Pflanzenzuchtverfahren, die gentechnische oder Gentechnik-ähnliche Methoden auf eine ungewohnte Art nutzen, und ihre Berücksichtigung in Lusser et al., Schaart & Visser und der vorliegenden Arbeit.....	4
Tabelle 2: Transgenese und Cisgenese – unterschiedliche Strategien zur Pflanzentransformation .....	43
Tabelle 3: Transgenese und Intragenese – unterschiedliche Strategien zur Pflanzentransformation .....	51
Tabelle 4: Kurzbeschreibung der 20 identifizierten Verfahren.....	76
Tabelle 5: Theoretisch mögliche Kombinierbarkeit der 20 identifizierten Verfahren .....	77
Tabelle 6: Einteilung der Verfahren in vier Gruppen nach Lusser & Rodriguez-Cerezo.....	78
Tabelle 7: Einteilung der Verfahren in vier Klassen gemäss Schaart & Visser und Tait & Barker.....	79
Tabelle 8: Art der Anwendung gentechnischer Methoden bei den 20 identifizierten Verfahren .....	82
Tabelle 9: Zweck der Nutzung gentechnischer Methoden bei den 20 identifizierten Verfahren .....	84
Tabelle 10: Stand der Entwicklung der neuen Verfahren .....	86
Tabelle 11: Einschätzung der Erkenn- und Identifizierbarkeit von Sorten aus den neuen Verfahren .....	87
Tabelle 12: Veröffentlichungen, in denen Sicherheitsaspekte der neuen Verfahren diskutiert werden.....	89

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Agroinfiltration von Blättern von <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	7
Abbildung 2: Vereinfachte schematische Darstellung des ODM-Verfahrens.....	17
Abbildung 3: Vereinfachte schematische Darstellung der RdDM .....	23
Abbildung 4: Schematische Darstellung des <i>Reverse Breeding</i> .....	30
Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der Beschleunigten Züchtung.....	36
Abbildung 6: Struktur eines typischen Pflanzengens .....	43
Abbildung 7: Drei möglichen Arten der Kombination von Pflanzentechnik und Gentechnik .....	58
Abbildung 8: Schematische Darstellung möglicher Strategien zum Einführen ZFN-kodierender Gene .....	64
Abbildung 9: Vereinfachte schematische Darstellung von ZFN-1, ZFN-2, ZFN-3 und ZFN-4 .....	65
Abbildung 10: Vereinfachte Darstellung der Zentromer-vermittelten Genomelimination .....	71
Abbildung 11: Vereinfachte Darstellung vier möglicher Strategien, mit denen sich genetisches Material und somit auch die gewünschte «Funktion» vorübergehend in Pflanzen, Pflanzenzellen oder Protoplasten einführen lassen .....	80

## Abkürzungen

ACRE	<i>Advisory Committee on Releases to the Environment</i>
APHIS	<i>Animal and Plant Health Inspection Service</i>
AWEL	Amt für Abfall, Wasser, Energie und Luft
BAC	<i>Biosafety Advisory Council</i>
BAFU	Bundesamt für Umwelt
COGEM	<i>Commissie genetische modificatie</i>
DH	Doppelhaploid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDI	Eidgenössisches Departement des Innern
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ENGL	<i>European Network of GMO Laboratories</i>
ESV	Einschliessungsverordnung
EU	Europäische Union
F <sub>1</sub>	Erste Filialgeneration
FrSV	Freisetzungsverordnung
GgE	Gewünschte genetische Eigenschaft
GT	<i>Gene Targeting</i>
GTG	Gentechnikgesetz
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
HR	Homologe Rekombination
IR	<i>Inverted repeat</i>
JRC	<i>Joint Research Centre</i>
LG	Linke Grenzsequenz
LNA	<i>Locked nucleic acid</i>
LwG	Landwirtschaftsgesetz
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
NRE	<i>New restriction enzymes</i>
NTWG	<i>New Techniques Working Group</i>
ODM	Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese
Oligo	Oligonukleotid
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
P-DNA	Pflanzen-DNA
PEG	Polyethylenglycol
PNA	Peptid-Nukleinsäure
PTGS	Posttranskriptionelles Gen-Silencing
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>
RB	<i>Reverse Breeding</i>
RdDM	RNA-dirigierte DNA-Methylierung
RDO	RNA-DNA-Oligonukleotid
RG	Rechte Grenzsequenz
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz

SBS	Sektion Biosicherheit
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SPT	<i>Seed Production Technology</i>
TALE	<i>Transcription Activator-Like Effector</i>
TALEN	<i>Transcription Activator-Like Effector Nuclease</i>
T-DNA	Transfer DNA
TFO	Tripelhelix formende Oligonukleotide
TGS	Transkriptionelles Gen-Silencing
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
USG	Umweltschutzgesetz
VGVL	Verordnung des EDI über gentechnisch veränderte Lebensmittel
VIGS	Virus-induziertes Gen-Silencing
VUGE	Virus-unterstützte Genexpression
Wt	Wildtyp
ZFN	Zinkfinger Nuklease
ZKBS	Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit

## Kurzfassung

### Ausgangslage und Zielsetzung

- Saat- und Pflanzgut gehören zu den wichtigsten Produktionsmitteln der Landwirtschaft. Um nachhaltig und marktorientiert produzieren zu können, bedarf es des stetigen Nachschubs neu gezüchteter Kulturpflanzensorten, die an die sich ändernden Bedingungen der Landwirtschaft angepasst sind.
- Der Umgang mit neu gezüchteten Pflanzensorten wird in der Schweiz abhängig von der Art der benutzten Züchtungsverfahren unterschiedlich reguliert. Gehen die Sorten aus einem gentechnischen Verfahren hervor, fällt der Umgang mit ihnen unter den Geltungsbereich des Gentechnikgesetzes (GTG). Stammen die Sorten aus einem Verfahren, das nicht als gentechnisch gilt, sind das Landwirtschaftsgesetz (LwG) und das Umweltschutzgesetz (USG) massgebend für den Umgang.
- Welche Organismen in der Schweiz als gentechnisch veränderte Organismen (GVO) gelten, ist im GTG definiert und in der Freisetzungsverordnung (FrSV) konkretisiert. Sowohl die Legaldefinition als auch die Konkretisierung sind über zwanzig Jahre alt.
- Gegenwärtig werden eine Reihe neuer Pflanzenzuchtverfahren erprobt, die gentechnische Methoden auf eine bisher ungewohnte Art und Weise nutzen und es zunehmend schwieriger machen, eine klare Trennlinie zwischen gentechnischen Verfahren und anderen Züchtungstechniken zu ziehen. Damit wird es verstärkt eine Sache der Auslegung, ob die aus den neuen Verfahren hervorgehenden Sorten nach geltendem Recht als GVO gelten oder nicht.
- Mit dem Fortschreiten der Entwicklung der neuen Pflanzenzuchtverfahren ist davon auszugehen, dass die neuen Verfahren in der Schweiz zur Anwendung kommen und Produkte aus den Verfahren via Importe auf den hiesigen Markt kommen.
- Der vorliegende Bericht will als Grundlage dienen, anhand derer das Bundesamt für Umwelt (BAFU) als federführendes Amt des GTG den aus den neuen Verfahren resultierenden Handlungsbedarf abschätzen und auf gut informierter Basis entscheiden kann, ob und falls ja, welche weiteren Schritte zur Regulierung der neuen Verfahren einzuleiten sind.

### Behandelte Verfahren und Aspekte

- Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf den zehn Pflanzenzuchtverfahren, die gegenwärtig auch in der EU von Arbeitsgruppen evaluiert werden und bereits bei Beginn der Arbeit bekannt waren. Diese zehn Verfahren sind:
  - Agroinfiltration
  - Beschleunigte Züchtung
  - Cisgenese
  - Intragenese
  - Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese (ODM)
  - Pflöpfen mit GVO
  - *Reverse Breeding* (RB)
  - RNA-dirigierte DNA-Methylierung (RdDM)
  - Virus-induziertes Gen-Silencing (VIGS)
  - Zinkfinger-Nukleasen-Technik (ZFN)
- Für die oben genannten Verfahren erfolgt eine technische Beschreibung, eine Schilderung möglicher Anwendungen in der Pflanzenzüchtung, eine Darstellung des Standes der Entwicklung sowie eine Antwort auf die Frage, ob sich die resultierenden Sorten mit PCR-Methoden erkennen und identifizieren lassen. Zudem werden für neun der zehn Verfahren Aspekte dargestellt, die bei der Sicherheitsbewertung und GVO-Klassierung der resultierenden Sorten eine Rolle spielen könnten.

- Im Verlauf der Arbeit sind weitere zehn Pflanzenzuchtverfahren ermittelt worden, die gentechnische Methoden auf eine ungewohnte Art und Weise nutzen. Diese Verfahren werden in der vorliegenden Arbeit kurz beschrieben und sind im Folgenden aufgelistet:
  - Gezielte chemische Mutagenese
  - Gezielte Mutagenese mittels T-DNA
  - Induzierte Hypomethylierung
  - Meganukleasen-Technik
  - Methyltransferasen-Technik
  - *Seed Production Technology* (SPT)
  - TALEN-Technik
  - Transformation mit Wildtyp Agrobakterien
  - Virus-unterstützte Genexpression (VUGE)
  - Zentromer-vermittelte Genomelimination
- Sechzehn der zwanzig identifizierten Verfahren lassen sich mit mindestens einem der anderen neuen Verfahren kombinieren. Bei mehreren Verfahren werden zudem unterschiedliche Varianten erprobt.

### **Kategorisierung der Verfahren nach Art der Anwendung gentechnischer Methoden**

- Hinsichtlich der Art der Anwendung gentechnischer Methoden lassen sich die zwanzig identifizierten Verfahren in zwei Kategorien einteilen: (I) Verfahren, die gentechnische Methoden auf eine direkte Art nutzen und zu Sorten führen, die das während des Verfahrens eingeführte genetische Material stabil in ihr Erbgut integriert haben, und (II) Verfahren, die gentechnische Methoden auf eine indirekte Art nutzen und zu Sorten führen, bei denen das während des Verfahrens eingeführte genetische Material im Endprodukt *nicht mehr* vorhanden ist.
- Bei fünf Verfahren werden gentechnische Methoden ausschliesslich auf eine direkte Art eingesetzt: Cisgenese, Gezielte Mutagenese mittels T-DNA, Intragenese, Pfropfen und Transformation mit Wildtyp-Agrobakterien.
- Bei den ZFN-, TALEN- und Meganukleasen-Techniken werden gentechnische Methoden je nach Variante auf eine direkte oder indirekte Art angewandt.
- Bei den restlichen zwölf Verfahren werden gentechnische Methoden ausschliesslich auf indirekte Art angewendet. Der Einsatz gentechnischer Methoden dient hier dazu, eine bestimmte «Funktion» *vorübergehend* in Pflanzen oder Pflanzenzellen einzubringen.

### **Kategorisierung der Verfahren nach Zweck der Anwendung gentechnischer Methoden**

- Hinsichtlich des Zwecks der Nutzung gentechnischer Methoden lassen sich drei Kategorien ausmachen: (I) die Nutzung zur Erzeugung genetischer Variation, (II) die Nutzung zur Erzeugung epigenetischer Variation und (III) die Nutzung als Mittel zur Unterstützung herkömmlicher Züchtungsverfahren.
- Bei zehn der zwanzig identifizierten Verfahren besteht der Zweck darin, genetische Variation zu erzeugen. Die Art der beabsichtigten genetischen Veränderung ist dabei je nach Verfahren oder Verfahrensvariante verschieden. Unterscheiden lassen sich der Transfer von Genen (z.B. Cisgenese und Intragenese), der Austausch von Basen (z.B. ODM), die Erzeugung von Indels (z.B. Variante der ZFN-Technik) sowie die Entfernung von Genen (z.B. Variante der ZFN-Technik).
- Bei drei Verfahren werden gentechnische Methoden eingesetzt, um im Erbgut der Pflanzen via DNA-Methylierung neue Epiallele zu erzeugen. Bei der Methyltransferasen-Technik und dem RdDM-Verfahren findet eine gezielte Methylierung vorbestimmter genomischer Sequenzabschnitte statt. Beim Verfahren der induzierten Hypomethylierung wiederum erfolgt die Methylierung ungezielt.

- Sieben Verfahren dienen dem Zweck, herkömmliche Züchtungsmethoden zu unterstützen. Agroinfiltration, VIGS und VUGE können als Selektionsverfahren eingesetzt werden, die Beschleunigte Züchtung kürzt die Kreuzungszüchtung zeitlich ab, das RB-Verfahren und die SPT erleichtern die Hybridzüchtung und das Verfahren der Zentromer-vermittelten Genomelimination unterstützt die Haploidenzüchtung.

### **Stand der Entwicklung**

- Neue Pflanzenzuchtverfahren werden in der Grundlagenforschung, in der angewandten Forschung sowie in der Züchtungsforschung entwickelt und schliesslich in Züchtungsprogrammen privater Firmen und/oder öffentlicher Institutionen zur Herstellung neuer Sorten eingesetzt.
- Bei vierzehn der zwanzig identifizierten Verfahren ist bekannt, dass sie in Züchtungsprogrammen eingesetzt werden.
- Eine kommerzielle Lancierung neuer Sorten ist bei elf der zwanzig identifizierten Verfahren in den kommenden fünf Jahren zu erwarten, falls die jeweiligen Sorten nicht wie GVO sondern wie herkömmlich gezüchtete Sorten reguliert werden.

### **Erkennung und Identifikation der Sorten aus den neuen Verfahren**

- Die Verfügbarkeit von Testmethoden, mit denen sich GVO erkennen und identifizieren lassen, spielt eine wichtige Rolle beim Vollzug der Gentechnikgesetzgebung. Da der Nachweis von GVO im Vollzug derzeit vorwiegend mit PCR-Methoden erfolgt, wird für die behandelten Pflanzenzuchtverfahren eingeschätzt, ob die aus ihnen hervorgehenden Sorten mittels PCR-Methoden erkannt und identifiziert werden können.
- Erkennung: Bei den dreizehn Verfahren, bei denen genetische oder epigenetische Variation erzeugt wird, dürfte sich in den Sorten die Existenz der Veränderung am genetischen Material mittels PCR-Methoden in Bezug auf einen Komparator erkennen lassen, falls Informationen über die Veränderung vorliegen.
- Identifikation: Bei den Verfahren, bei denen gentechnische Methoden auf eine direkte Art eingesetzt werden, dürfte in den Sorten die Existenz der Veränderung mittels PCR-Methoden als Veränderung zu identifizieren sein, die absichtlich durch das Verfahren eingeführt worden ist. Die eindeutige Identifikation dürfte dabei nur dann möglich sein, wenn Informationen über die Veränderung vorliegen. Bei den Verfahren, bei denen gentechnische Methoden auf eine indirekte Art eingesetzt werden, dürfte eine eindeutige Identifikation mittels PCR-Methoden in der Regel nicht möglich sein.
- Bei den Verfahren, die der Unterstützung herkömmlicher Züchtungsmethoden dienen und bei denen keine Veränderungen am genetischen Material beabsichtigt werden, lassen sich die resultierenden Sorten mittels PCR-Methoden weder erkennen noch identifizieren.

### **Sicherheitsaspekte**

- Ob eine aus den neuen Zuchtverfahren hervorgehende Sorte unbeabsichtigt Eigenschaften aufweist, die in unerwünschter Weise auf Mensch, Tier oder Umwelt einwirken könnten, hängt vom Phänotyp der Sorte ab und kann nur von Fall zu Fall beurteilt werden. Ob eine neu Sorten wiederum ein Risiko für Mensch, Tier und Umwelt darstellt, hängt nicht allein vom Phänotyp der Sorte ab, sondern auch von Expositionsfaktoren wie zum Beispiel dem Ausmass, mit welchem eine Sorte angebaut wird, oder der Konsummenge.
- Da kaum konkrete Daten über Eigenschaften einzelner Sorten aus den neuen Verfahren vorliegen, wird in der Literatur hauptsächlich darüber diskutiert, wie die Sicherheit der neuen

Verfahren im Vergleich zu herkömmlichen Zuchtverfahren und zur Transgenese einzustufen ist. Ein zentraler Aspekt dieser Diskussion ist das mögliche Auftreten von unbeabsichtigten Wirkungen.

- Für neun der zwanzig identifizierten Verfahren wird in der vorliegenden Arbeit dargestellt, ob und wie der jeweilige Züchtungsprozess in den resultierenden Sorten zu unbeabsichtigten Wirkungen führen kann.

### **Aspekte der GVO-Klassierung**

- Ob die aus den zwanzig beschriebenen Verfahren hervorgehenden Sorten nach geltendem Recht als GVO zu klassieren sind oder nicht, ist für jedes Verfahren unter Berücksichtigung möglicher Varianten und Kombinationen einzeln zu prüfen.
- In der vorliegenden Arbeit werden Aspekte und Fragen diskutiert, die bei der GVO-Klassierung eine Rolle spielen könnten.
- Die Cisgenese und gewisse Varianten der Zinkfinger-Nukleasen-, TALEN- und Meganukleasen-Techniken können den Kriterien der Selbstklonierung entsprechen, weshalb sich die Frage stellt, ob die aus diesen Verfahren beziehungsweise Verfahrensvarianten hervorgehenden Sorten aus dem Geltungsbereich des GTG fallen können oder nicht?
- Beim Pfropfen ist zu klären, ob Nachkommen eines Reisers, der auf einen gentechnisch veränderten Wurzelstock gepfropft wurde, als GVO zu klassieren sind oder nicht.
- Bei Verfahren, die im Erbgut von Pflanzen zu einem Allelaustausch führen können, stellt sich die Frage, welcher der folgenden beiden Aspekte bei der GVO-Klassierung überwiegt: Ist es der Aspekt der Insertion von Nukleinsäuren ins Erbgut des Organismus? Oder ist es der Aspekt, dass die Veränderungen am genetischen Material Mutationen sind? Zu klären könnte dabei auch die Frage sein, ob die Anzahl der in einer bestimmten endogenen Sequenz ausgetauschten Basen entscheidend für die GVO-Klassierung sein kann oder nicht?
- Bei der Transformation mit Wildtyp Agrobakterien bleibt zu klären, ob das Verfahren rechtlich als gentechnisches Verfahren gilt oder nicht.
- Werden gentechnische Methoden auf eine indirekte Art angewendet, können aus den Verfahren Sorten hervorgehen, die frei von extrazellulär eingeführtem genetischem Material sind. Bei der GVO-Klassierung dieser Sorten stellen sich hauptsächlich folgende fünf Fragen: (I) Gelten Kreuzungsnachkommen einer stabil transformierten Pflanze als GVO, wenn sie frei vom ursprünglich transformierten genetischen Material sind? (II) Gelten Nachkommen von Pflanzen, die sich aus transfizierten Zellen regeneriert haben, als GVO, wenn sie das ursprünglich transfizierte, genetische Material nicht mehr enthalten? (III) Gelten Nachkommen von Pflanzen, die in etlichen ihrer Zellen rekombinante Viren enthielten, als GVO, wenn sie frei vom rekombinanten Virus sind? (IV) Gelten Nachkommen eines Reisers, der auf einen stabil transformierten Wurzelstock gepfropft ist, als GVO? (V) Spielt es bei der Beantwortung der ersten vier Fragen eine Rolle, ob die Nachkommen andere Veränderungen als Insertionen extrazellulärer Nukleinsäuren in ihrem genetischen Material aufweisen, die auf die Anwendung gentechnischer Methoden zurückgehen?

### **Regulatorische Aspekte**

- Aspekte und Fragen, die bei der Regulierung der Sorten aus den neuen Verfahren eine Rolle spielen beziehungsweise zu beantworten sein könnten, werden dargestellt und diskutiert. Der Fokus liegt dabei auf der Gentechnikgesetzgebung.



- Biosicherheit: Ob und wie eine Pflanzensorte, die aus einem der neuen Verfahren hervorgeht, auf die Schutzgüter einwirkt, lässt sich nur in einer Einzelfallprüfung feststellen. Unabhängig von der GVO-Klassierung der neuen Sorten, stellt sich aus regulatorischer Sicht sich die Frage, wer die Einzelfallprüfung vornehmen soll? Ist es je nach Verfahren gerechtfertigt, dass Prüfung und Bewertung einer strengen staatlichen Aufsicht obliegen (wie für GVO gemäss GTG)? Oder ist es je nach Verfahren angemessen, Prüfung und Bewertung hauptsächlich der Eigenverantwortung der Hersteller und Importeure zu unterstellen (wie für nicht-GVO gemäss USG/LwG)?
- Wahlfreiheit: Wird entschieden, dass die Sorten eines der neuen Verfahren als GVO zu klassieren, so sind diese Sorten beim Inverkehrbringen als GVO zu kennzeichnen. Die Pflicht zur Kennzeichnung besteht auch für die aus den Sorten gewonnenen Lebens- und Futtermittel. Da die Sorten und die daraus erzeugten Produkte zu kennzeichnen sind, sind die Wahlfreiheit der KonsumentInnen (Lebensmittel) wie auch die Wahlfreiheit der LandwirtInnen (Saatgut, Futtermittel) ermöglicht. Neue Herausforderungen beim Vollzug könnten sich in den Fällen ergeben, in denen die Sorten und somit auch die aus ihnen gewonnenen Erzeugnisse stofflich nicht eindeutig als GVO identifizierbar sind. Wird hingegen entschieden, dass die Sorten eines der neuen Verfahren *nicht* als GVO zu klassieren, so sind diese Sorten beim Inverkehrbringen auch nicht als GVO zu kennzeichnen. In diesem Fall stellt sich die Frage, ob die Wahlfreiheit beeinträchtigt wird, wenn die Anwendungen der Gentechnik im Züchtungsprozess für KonsumentInnen und LandwirtInnen unsichtbar bleiben?
- Achtung der Würde der Kreatur: Die Tätigkeit, bei der die Würde der Kreatur bei Pflanzen missachtet werden könnte, ist die gentechnische Veränderung des Erbguts im geschlossenen System. Wie die neuen Verfahren hinsichtlich der Würde der Pflanze zu handhaben sind, bleibt zu beantworten: Ist die Würde der Pflanze nur dann zu achten, wenn bei der Anwendung der neuen Verfahren eine Pflanze mit neu inserierten Genen entsteht – sei es als Endprodukt oder in einem Zwischenschritt des Verfahrens. Oder ist der Würde der Pflanze bei allen Sorten zu achten, bei denen mit den neuen Verfahren Veränderungen im genetischen Material hervorgerufen werden?
- Überprüfung der Abwesenheit extrazellulär eingeführter DNA: Aus Verfahren, in denen gentechnische Methoden indirekt angewendet werden, können Sorten hervorgehen, die frei von extrazellulär eingeführtem genetischen Material sind. Aus regulatorischer Sicht kann hier die Frage gestellt werden, wer mit welchen Methoden vor einem Freisetzungsversuch und vor dem Inverkehrbringen einer Sorte die Abwesenheit des extrazellulär eingeführten genetischen Materials nachweist. Soll dieser Nachweis der Sorgfaltspflicht und der Selbstkontrolle der Hersteller obliegen oder unter staatliche Kontrolle gestellt werden?
- Internationale Handelsbeziehungen: Die Schweiz führt Pflanzensorten und daraus hergestellte Produkte sowohl ein als auch aus. Ob sich bei der Ein- und Ausfuhr von Sorten aus den neuen Pflanzenzuchtverfahren auch neue regulatorische Fragen ergeben werden, hängt davon ab, wie die Sorten in den einzelnen Ländern reguliert werden und ob die jeweiligen Regulierungen sich von der hiesigen Regulierung unterscheiden. Welche Ansätze zur Regulierung der neuen Verfahren international verfolgt werden, ist in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht worden. Bekannt ist, dass die regulatorischen Fragen in verschiedenen Ländern von den zuständigen Behörden und Kommissionen diskutiert werden.

# 1. Einleitung

## 1.1 Ausgangslage

Saat- und Pflanzgut gehören zu den wichtigsten Produktionsmitteln der Landwirtschaft. Um nachhaltig und marktorientiert produzieren zu können, sind LandwirtInnen auf den stetigen Nachschub neuer Kulturpflanzensorten angewiesen. Für die Zufuhr neuer Sorten sorgen Pflanzenzuchtfirmen und öffentliche Zuchtprogramme. Sie stellen laufend genetisch veränderte Sorten her, die an die sich ändernden Bedingungen und Bedürfnisse der Landwirtschaft angepasst sind. Für die genetische Veränderung bestehender Sorten steht der Pflanzenzüchtung heute eine breite Palette an Verfahren bereit. Dazu gehören seit Mitte der 1980er Jahre auch gentechnische Verfahren, die den gezielten Transfer isolierter DNA ermöglichen.

Das Herstellen, das Testen in der Umwelt und das Inverkehrbringen von neuen Pflanzensorten werden in der Schweiz abhängig von der Art der benutzten Züchtungsverfahren unterschiedlich reguliert. Stammen die neuen Sorten aus gentechnischen Verfahren, fällt der Umgang mit den resultierenden gentechnisch veränderten Sorten massgeblich unter den Geltungsbereich des Gentechnikgesetzes (GTG). Stammen die Sorten hingegen aus Verfahren, die nicht als gentechnisch gelten, sind das Landwirtschaftsgesetz (LwG) und das Umweltschutzgesetz (USG) massgebend für den Umgang.

Welche Organismen in der Schweiz als gentechnisch veränderte Organismen (GVO) gelten, ist im GTG definiert und in der Freisetzungsverordnung (FrSV) konkretisiert. Die Legaldefinition und die Konkretisierung sind mittlerweile über 20 Jahre alt, stammen sie doch beide aus Richtlinien der EU, die 1990 in Kraft gesetzt wurden. Während die Legaldefinition und die Konkretisierung des Begriffs GMO seit ihren Ursprüngen materiell unverändert geblieben sind, sind in der Grundlagen- und Züchtungsforschung neue Verfahren entwickelt worden, die gentechnische Methoden auf eine Art und Weise anwenden, wie sie 1990 nicht absehbar war.

Bislang führte der Einsatz gentechnischer Methoden in der Pflanzenzüchtung zu Sorten mit den folgenden beiden Merkmalen: (I) Im Erbgut der Sorte ist von ausserhalb der Pflanze zugeführte DNA inseriert und (II) die neu inserierte DNA stammt ganz oder teilweise von artfremden Organismen. Bei den neu entwickelten Verfahren kann der Einsatz gentechnischer Methoden hingegen in Sorten resultieren, die entweder nur das erste Merkmal (Insertion von ausserhalb zugefügter DNA) oder gar keines der beiden Merkmale aufweisen. Eine Besonderheit der neuen Verfahren ist somit: Sie nutzen zwar gentechnische Methoden, führen aber zu Sorten, die frei von artfremder DNA sind. Da die resultierenden Sorten nur Gene in ihrem Erbgut besitzen können, die bereits Teil des Genpools der jeweiligen Kulturart sind, sind sie – im Prinzip – auch mit herkömmlichen, also *nicht* gentechnischen Verfahren züchtbar.

Mit der Entwicklung der neuen Pflanzenzuchtverfahren wird es zunehmend schwieriger, eine klare Trennlinie zwischen gentechnischen Verfahren und anderen Züchtungstechniken zu ziehen. Da dadurch auch die charakteristischen Unterschiede zwischen GMO und nicht-GMO schwinden, wird es verstärkt eine Sache der Auslegung, ob die aus den neuen Verfahren hervorgehenden Sorten gemäss Legaldefinition des GTG als GMO zu betrachten sind oder nicht. Damit stehen wiederum die Fragen im Raum, ob die Legaldefinition des Begriffs GMO neu zu verhandeln ist und wie die aus den neuen Verfahren hervorgehenden Sorten zu regulieren sind?

Mit dem Fortschreiten der Entwicklung der neuen Verfahren ist davon auszugehen, dass die neuen Verfahren in der Schweiz zur Anwendung kommen und Produkte aus den Verfahren via Importe auf den hiesigen Markt gelangen. Um den daraus entstehenden Handlungsbedarf evaluieren zu können, hat das Bundesamt für Umwelt (BAFU) die im Kanton Zürich für den Vollzug der FrSV zu-

ständige Sektion Biosicherheit (SBS) des Amtes für Abfall, Wasser, Energie und Luft (AWEL) damit beauftragt, einen Grundlagenbericht zu den neuen Verfahren zu erstellen.

## **1.2 Zielsetzung**

Der vorliegende Bericht soll dem BAFU als Basis dienen, um den aus den neuen Verfahren entstehenden Handlungsbedarf abschätzen und auf gut informierter Basis einen Entscheid treffen zu können, ob und falls ja, welche weiteren Schritte zur Regulierung der neuen Sorten notwendig werden. Um als Basis für etwaige weitere Entscheide dienen zu können, will der Bericht nicht nur die inhaltlichen Sachverhalte darstellen sondern auch mögliche Fragen aufwerfen, die sich im Zusammenhang mit den neuen Verfahren auf rechtlicher oder regulatorischer Ebene stellen könnten.

## **1.3 Behandelte Verfahren und Aspekte**

Der Fokus des Berichts liegt auf den zehn Verfahren, die in Lusser et al. (2011) und/oder Schaart & Visser (2009) dargestellt werden und zur Beginn der vorliegenden Arbeit bekannt waren (Tabelle 1). Diese Verfahren sind: Agroinfiltration, Beschleunigte Züchtung, Cisgenese, Intragenese, Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese, Pfropfen<sup>1</sup>, *Reverse Breeding*, RNA-dirigierte DNA-Methylierung, Virus-induziertes Gen-Silencing und Zinkfinger-Nukleasen-Technik. Für jedes dieser Verfahren erfolgt eine technische Beschreibung, eine Schilderung möglicher Anwendungen in der Pflanzenzüchtung, eine Darstellung des Standes der Entwicklung sowie eine Antwort auf die Frage, ob sich die resultierenden Sorten mit PCR-Methoden erkennen und identifizieren lassen. Zudem werden für jedes Verfahren Aspekte dargestellt, die bei der Sicherheitsbewertung und GVO-Klassierung der resultierenden Sorten eine Rolle spielen könnten. In Bezug auf die letzteren beiden Aspekte bildet die Zinkfinger-Nukleasen-Technik eine Ausnahme. Sie beinhaltet mehrere Verfahrensvarianten, die im Hinblick auf Sicherheitsaspekte und GVO-Klassierung separat behandelt werden müssten, was innerhalb des Projektrahmens nicht möglich war.

Neben den ursprünglich bekannten Verfahren sind im Verlaufe der Arbeit in der Literatur weitere zehn Pflanzenzuchtverfahren entdeckt worden, die gentechnische oder Gentechnik-ähnliche Methoden auf eine ungewohnte Art und Weise nutzen und deshalb ebenfalls rechtliche und regulatorische Fragen aufwerfen könnten (Tabelle 1). Diese Verfahren sind: Gezielte chemische Mutagenese, Gezielte Mutagenese mittels T-DNA, Induzierte Hypomethylation, Meganukleasen-Technik, Methyltransferasen-Technik, *Seed Production Technology*, TALEN-Technik, Transformation mit Wildtyp-Agrobakterien, Virus-unterstützte Genexpression und Zentromer-vermittelte Genomelimination. Für diese zehn Verfahren erfolgen jeweils eine technische Beschreibung, eine Schilderung möglicher Anwendungen in der Pflanzenzucht sowie eine Darstellung des Standes der Entwicklung.

### **1.3.1 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden**

Die Verfügbarkeit von Testmethoden, mit denen sich GVO erkennen und identifizieren lassen, spielt eine wichtige Rolle beim Vollzug der Gentechnikgesetzgebung. Im vorliegenden Bericht wird deshalb, wie oben erwähnt, der Frage nachgegangen, ob sich Sorten, die aus den neuen Pflanzenzuchtverfahren hervorgehen, mittels PCR-Methoden als GVO nachweisen liessen. Der Fokus liegt auf den PCR-Methoden, weil diese einen routinemässigen Einsatz erlauben und heute in der Vollzugspraxis die Methode der Wahl sind.

---

<sup>1</sup> Fusion von gentechnisch veränderten mit gentechnisch nicht veränderten Pflanzen mittels Pfropfen. Das Verfahren wird im vorliegenden Bericht der Einfachheit halber als «Pfropfen» bezeichnet.

Bei der Frage nach der Nachweisbarkeit wird im vorliegenden Bericht unterschieden zwischen der Möglichkeit der Erkennung und der Möglichkeit der Identifikation. Mit Erkennung ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte festzustellen und zwar in Bezug auf eine geeignete Vergleichssorte. Mit Identifikation wiederum ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte als Veränderung zu erkennen, die absichtlich durch ein bestimmtes Verfahren eingeführt worden ist. Inwiefern neben den PCR-Methoden weitere Nachweisverfahren für die Erkennung und Identifikation von Sorten aus den neuen Pflanzenzuchtverfahren zur Verfügung stehen, wird im vorliegenden Bericht nicht untersucht.

### **1.3.2 Aspekte der Biosicherheit**

Wie weiter oben beschrieben werden für neun der zwanzig identifizierten Verfahren jeweils Aspekte aufgeführt, die bei der Bewertung der Sicherheit der einzelnen Verfahren beziehungsweise der jeweils daraus hervorgehenden Sorten eine Rolle spielen *könnten*. Dabei werden für die einzelnen Verfahren jeweils die Prozesse identifiziert, die in den resultierenden Sorten zu unbeabsichtigten Wirkungen führen können. Unbeabsichtigte Wirkungen können neutral, erwünscht oder unerwünscht sein und kommen bei allen Pflanzenzuchtverfahren vor. Indem jeweils dargestellt wird, ob die identifizierten Prozesse auch bei herkömmlichen Züchtungsverfahren vorkommen, lässt sich beantworten, ob die Prozesse spezifisch für das jeweilige Verfahren sind oder nicht. Das Ziel dieses Vorgehens ist, eine erste Basis zu legen, um die neuen Verfahren in Bezug auf die Biosicherheit mit herkömmlichen Verfahren zu vergleichen.

### **1.3.3 Aspekte der GVO-Klassierung**

Wie weiter oben beschrieben werden für neun der zwanzig identifizierten Verfahren Aspekte beschrieben, die bei der GVO-Klassierung der resultierenden Sorten nach geltendem Recht eine Rolle spielen *könnten*. Dabei werden jeweils in hermeneutischer Art und Weise unterschiedliche Sichtweisen und Interpretationsmöglichkeiten aufgezeigt, die bei der GVO-Klassierung eingenommen beziehungsweise bestehen könnten. Dieses Vorgehen dient dem Aufzeigen möglicher Unsicherheiten bei der GVO-Klassierung sowie der Klärung der Frage, ob ein Bedarf besteht, die bestehenden Rechtsnormen zu konkretisieren. Damit will der vorliegende Bericht weder auf die Frage eine Antwort geben, ob die aus den neuen Verfahren resultierenden Sorten nach geltendem Recht GVO sind oder nicht, noch will er beantworten, ob die resultierenden Sorten GVO sein *sollten* oder nicht.

## **1.4 Aufbau des Berichts**

Kapitel 2 stellt kurz dar, welche Organismen nach geltendem Recht in der Schweiz als GVO gelten. Diese Darstellung dient als Basis, um in den weiteren Kapiteln Aspekte der GVO-Klassierung der aus den neuen verfahren hervorgehenden Sorten diskutieren zu können. In Kapitel 3 werden für die einzelnen Verfahren die oben beschriebenen Aspekte behandelt. Kapitel 4 stellt eine Synopsis dar, wobei die in Kapitel 3 dargestellten Sachverhalte zusammenfassend aufgerollt werden. In der Synopsis erfolgt zuerst eine Kategorisierung der neuen Verfahren. Dann werden kurze Überblicke über die Erkennung und Identifikation der Sorten aus den neuen Verfahren sowie über den Stand der Entwicklung gegeben. Anschliessend werden die Fragen und Aspekte resümiert, die bei der Sicherheitsbewertung und GVO-Klassierung der Sorten aus den neuen Verfahren eine Rolle spielen könnten. In Kapitel 5 werden schliesslich Aspekte dargestellt und Fragen aufgeworfen, die bei der Regulierung der Sorten aus den neuen Verfahren eine Rolle spielen beziehungsweise zu beantwor-

ten sein könnten. Der Fokus liegt dabei auf dem GTG. Zu den Aspekten, die dargestellt werden, gehören Biosicherheit, Wahlfreiheit, Würde der Pflanze und Internationale Handelsbeziehungen.

**Tabelle 1: 20 in der Literatur identifizierte Pflanzenzuchtverfahren, die gentechnische oder Gentechnik-ähnliche Methoden auf eine ungewohnte Art nutzen, und ihre Berücksichtigung in Lusser et al. (2011), Schaart & Visser (2009) und der vorliegenden Arbeit.**

<b>Verfahren</b>	<b>Lusser et al. 2011</b>	<b>Schaart &amp; Visser 2009</b>	<b>Vorliegender Bericht</b>
Agroinfiltration	✓	✓	✓*
Beschleunigte Züchtung		✓	✓*
Cisgenese	✓	✓	✓*
Gezielte chemische Mutagenese			✓
Gezielte Mutagenese via T-DNA			✓
Induzierte Hypomethylation			✓
Intragenese	✓	✓	✓*
Meganukleasen-Technik			✓
Methyltransferasen-Technik			✓
Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese	✓	✓	✓*
Pfropfen	✓	✓	✓*
Reverse Breeding	✓	✓	✓*
RNA-dirigierte DNA-Methylierung	✓		✓*
Seed Production Technology			✓
TALEN-Technik			✓
Transformation mit Wt Agrobakterien			✓
Virus-induziertes Gen-Silencing		✓	✓*
Virus-unterstützte Genexpression			✓
Zentromer-vermittelte Genomelimination			✓
Zinkfinger-Nukleasen-Technik	✓		✓*

✓: Die Verfahren werden berücksichtigt und zumindest technisch beschrieben. ✓\*: Die Verfahren waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit bekannt und werden – mit Ausnahme der Zinkfinger-Nukleasen-Technik – im vorliegenden Bericht anders als die anderen Verfahren auch hinsichtlich der Aspekte behandelt, die bei der Sicherheitsbewertung und der GVO-Klassierung eine Rolle spielen könnten. Wt: Wildtyp.

## 2. GVO-Legaldefinition

Welche Organismen in der Schweiz rechtlich als GVO gelten, ist 1995 bei der Änderung des Umweltschutzgesetz (USG) erstmals definiert worden. 1999 erfolgte in der Freisetzungsverordnung (FrSV) eine Konkretisierung und ausführliche Umschreibung des Begriffs GVO. Sowohl bei der Legaldefinition wie auch bei der Konkretisierung und Umschreibung hatte der Gesetzgeber weitgehend auf die damals gültigen EU-Richtlinien 90/219/EWG und 90/220/EWG zurückgegriffen (EDI 1997). Welche Organismen heute als GVO gelten, wurde somit Ende der 1980er Jahre verhandelt und 1990 in den beiden EU-Richtlinien erstmals in Kraft gesetzt.

Nach geltendem Schweizer Recht sind GVO Organismen, «deren genetisches Material so verändert worden ist, wie dies unter natürlichen Bedingungen durch Kreuzen oder natürliche Rekombination nicht vorkommt» (Art. 5 Abs. 2 GTG; Art. 7 Abs. 5ter USG). GVO kennzeichnen sich somit dadurch aus, dass ihr genetisches Material in einem gentechnischen Verfahren verändert worden ist, also in einer Weise, wie dies unter natürlichen Bedingungen – wie durch Kreuzen oder natürliche Rekombination – nicht vorkommt (Errass 2006, Keller 2002).

Auf Verordnungsstufe wird der Begriff GVO weiter konkretisiert und ausführlich umschrieben (Art. 3 Abs. Bst. d FrSV und Anhang 1 FrSV; siehe Box 1). Bei der ausführlichen Umschreibung hat der Gesetzgeber den Begriff GVO von zwei Seiten beleuchtet: Einerseits werden Verfahren bezeichnet, die in der Regel zu GVO führen, andererseits sind auch Verfahren beschrieben, die in der Regel nicht zu GVO führen (siehe Box 1). Damit wird unterschieden zwischen gentechnischen und nicht-gentechnischen Verfahren.

Gentechnische Verfahren sind gemäss EDI (1997) solche Verfahren, die zu gentechnisch veränderten Organismen führen, das heisst zu Organismen, deren genetisches Material derart verändert ist, wie es gemäss Wissensstand unter natürlichen Bedingungen nicht zu erwarten ist. Anhang 1 FrSV führt in einer nicht abschliessenden Liste folgende Verfahren als gentechnische Verfahren auf: Nukleinsäuren-Rekombinationstechniken, Verfahren, bei denen direkt genetisches Material eingeführt wird, sowie gewisse Zellfusions- oder Hybridisierungsverfahren. Den gentechnischen Verfahren gleichgestellt wird die Selbstklonierung von pathogenen Organismen.

Nicht-gentechnische Verfahren sind gemäss EDI (1997) Verfahren, bei welchen das genetische Material unangetastet bleibt oder bei welchen Veränderungen im genetischen Material hervorgerufen werden, wie sie in der Umwelt vorkommen können. Zu diesen Verfahren gehören unter anderem die Fusion von Pflanzenzellen, die Mutagenese und Verfahren, in denen der Chromosomensatz eines Organismus verändert wird. Die aus diesen Verfahren hervorgehenden Organismen können als nicht gentechnisch verändert angesehen werden. Diese Regel gilt jedoch nicht, wenn die Verfahren mit dem Einsatz von rekombinanten Nukleinsäuren oder von GVO verbunden sind.

Legaldefinition und Konkretisierung des Begriffs GVO haben sowohl eine Prozess-bezogene sowie eine Produkt-bezogene Komponente. Prozess-bezogen ist die Bezeichnung von Verfahren, die in der Regel zu GVO führen. Die dazu in Anhang 1 FrSV vorhandene Aufzählung gentechnischer Verfahren ist nicht abschliessend. Produkt-bezogen ist, dass sich ein GVO dadurch auszeichnet, dass er im Vergleich zur Ausgangspflanze eine Veränderung in seinem genetischen Material aufweist. Unterschiedlich interpretierbar ist, worauf sich der in der Legaldefinition enthaltene Relativsatz «wie dies unter natürlichen Bedingungen durch Kreuzen oder natürliche Rekombination nicht vorkommt» bezieht. Knüpft der Relativsatz an das Verfahren an, liegt der Schwerpunkt von Legaldefinition und Konkretisierung auf dem Prozess. Bezieht er sich hingegen auf die Veränderung am genetischen Material, fällt der Schwerpunkt eher auf das Produkt.

**Box 1:** Wortlaut der Definition, Konkretisierung und Umschreibung des Begriffs GVO in der FrSV.

### Art. 3 Begriffe

<sup>1</sup> Im Sinne dieser Verordnung gelten als:

- d. gentechnisch veränderte Organismen: Organismen, deren genetisches Material durch gentechnische Verfahren nach Anhang 1 so verändert worden ist, wie dies unter natürlichen Bedingungen durch Kreuzen oder natürliche Rekombination nicht vorkommt, sowie pathogene oder gebietsfremde Organismen, die zugleich gentechnisch verändert sind;

## Anhang 1

(Art. 3 Bst. d)

### Definition gentechnischer Verfahren

<sup>1</sup> Als gentechnische Verfahren gelten insbesondere:

- a. Nukleinsäuren-Rekombinationstechniken, bei denen durch die Insertion von Nukleinsäuremolekülen, die ausserhalb eines Organismus erzeugt wurden, in Viren, bakteriellen Plasmiden oder anderen Vektorsystemen neue Kombinationen von genetischem Material gebildet und in einen Empfängerorganismus eingesetzt werden, in dem sie unter natürlichen Bedingungen nicht vorkommen, aber vermehrungsfähig sind;
- b. Verfahren, bei denen in einen Organismus direkt genetisches Material eingeführt wird, das ausserhalb des Organismus hergestellt wurde, insbesondere Mikroinjektion, Makroinjektion und Mikroverkapselung, Elektroporation oder Verwendung von Mikroprojektilen;
- c. Zellfusion oder Hybridisierungsverfahren, bei denen Zellen mit neuen Kombinationen von genetischem Material durch die Verschmelzung zweier oder mehrerer Zellen mit Hilfe von Methoden erzeugt werden, die unter natürlichen Bedingungen nicht vorkommen.

<sup>2</sup> Den gentechnischen Verfahren gleichgestellt ist die Selbstklonierung pathogener Organismen. Diese besteht in der Entfernung von Nukleinsäuresequenzen aus einer Zelle eines Organismus und einer vollständigen oder teilweisen Insertion dieser Nukleinsäuren oder eines synthetischen Äquivalents (allenfalls nach einer vorausgehenden enzymatischen oder mechanischen Behandlung) in Zellen derselben Art oder in Zellen, die phylogenetisch eng verwandt sind und untereinander genetisches Material über natürliche physiologische Prozesse austauschen können.

<sup>3</sup> Nicht als gentechnische Verfahren gelten die Selbstklonierung nicht pathogener Organismen sowie die nachstehenden Verfahren, wenn sie nicht mit dem Einsatz von rekombinanten Nukleinsäuremolekülen oder von gentechnisch veränderten Organismen verbunden sind:

- a. Mutagenese;
- b. Zell- und Protoplastenfusion von prokaryontischen Mikroorganismen, die untereinander genetisches Material über natürliche physiologische Prozesse austauschen;
- c. Zell- und Protoplastenfusion von eukaryontischen Zellen, einschliesslich der Erzeugung von Hybridomen-Zellen und der Fusion von Pflanzenzellen;
- d. In-vitro-Befruchtung;
- e. natürliche Prozesse wie Konjugation, Transduktion oder Transformation;
- f. Veränderung des Ploidie-Niveaus, einschliesslich der Aneuploidie, und Elimination von Chromosomen.

### 3. Neue Pflanzenzuchtverfahren

#### 3.1 Agroinfiltration

Agroinfiltration ist ein Verfahren, das rekombinante Agrobakterien dazu nutzt, um in Geweben von Pflanzen eine vorübergehende Expression genetischer Konstrukte zu erreichen. Die Integration der Konstrukte in Keimzellen wird nicht beabsichtigt. Das Verfahren kommt hauptsächlich in der Forschung zum Einsatz, kann aber auch in Züchtungsprogrammen genutzt werden (Lusser et al. 2011, Schaart & Visser 2009). Da Stecklinge und Samen infiltrierter Pflanzen weiterverwendet werden können, stellt sich die Frage, wie diese zu regulieren sind (COGEM 2006a).

Falls bei der Agroinfiltration rekombinante Agrobakterien verwendet werden, die virale Vektoren enthalten, wird das Verfahren Agroinfektion (Grimsley et al. 1986) oder Agroinokulation (Elmer et al. 1988) genannt. Agroinfektion und Agroinokulation können auch dem Virus-induziertem Gen-Silencing (VIGS; Abschnitt 3.2) oder der Virus-unterstützten Genexpression (VUGE; Abschnitt 3.11.8) zugeordnet werden.

Das *floral dip*-Verfahren, bei dem die Blüten einer Pflanze in eine Agrobakteriensuspension getaucht werden, kann ebenfalls der Agroinfiltration zugerechnet werden (Lusser et al. 2011). Das Verfahren wird hier jedoch nicht behandelt, weil es zu stabil transformierten, gentechnisch veränderten Pflanzen und damit zu GVO-Produkten führt.



**Abbildung 1:** Agroinfiltration von Blättern von *Nicotiana benthamiana*. Quelle: Chandres, Wikimedia.

##### 3.1.1 Beschreibung des Verfahrens

Bei der Agroinfiltration wird das Gewebe einer Pflanze, meistens sind es Blätter, mit einer flüssigen Suspension von rekombinanten Agrobakterien infiltriert. Die Infiltration kann mit Hilfe von Spritzen (Abbildung 1) oder Zahnstochern sowie durch das Anlegen eines Vakuums erfolgen. Falls Wurzeln das Zielgewebe sind, kann die Infiltration auch durch blosses Eintauchen in eine Agrobakteriensuspension gelingen (Agrodrench-Verfahren, Ryu et al. 2004).

Sind die rekombinanten Agrobakterien in den Pflanzenzellen, wird ihre T-DNA in den Zellkern transportiert, wo es zur vorübergehenden Expression der rekombinanten Gene kommt. Die Gene auf der T-DNA können dabei als freie DNA-Moleküle aktiv werden; sie müssen somit nicht in das Erbgut der Pflanzenzellen integriert sein, um exprimiert zu werden (Schaart & Visser 2009).



Je nach Genkonstrukt, das via rekombinante Agrobakterien in das Pflanzengewebe infiltriert wird, können zwei Typen von Agroinfiltration unterschieden werden (Lusser et al. 2011):

1. «Agroinfiltration im eigentlichen Sinne»: Die Infiltration erfolgt mit Agrobakterien, die nicht-replikative Genkonstrukte enthalten. Die Expression der eingeführten Gene ist lokal beschränkt auf den Bereich der Pflanze, der infiltriert worden ist. Je nach Design der nicht-replikativen Genkonstrukte, kann es dabei zur Bildung eines Proteins oder zur Stilllegung eines endogenen Gens kommen. Falls Gene vorübergehend stillgelegt werden sollen, können die Genkonstrukte so designt werden, dass sie einen *inverted repeat* enthalten (IR-Konstrukte). Diese sorgen in der Zelle für die Produktion von doppelsträngiger DNA, die via RNA-Interferenz (RNAi) zur Stilllegung von Genen führen (Schaart & Visser 2009).
2. «Agroinokulation» oder «Agroinfektion»: Die Infiltration erfolgt mit Agrobakterien, die replikative Genkonstrukte enthalten. Die einzuführenden Gene werden dazu erst in einen viralen Vektor eingebaut, der dann wiederum in die T-DNA integriert wird. Da der virale Vektor innerhalb der Zellen repliziert und sich verbreitet, erfolgt die Expression der Gene in der ganzen Pflanze. Je nach Design des replikativen Genkonstruktes kann es dabei zur Bildung eines Proteins oder zur Stilllegung eines endogenen Genes kommen. Ersterer Fall kann auch dem VUGE (Abschnitt 3.11.8), letzterer Fall dem VIGS (Abschnitt 3.2) zugerechnet werden.

### 3.1.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

In der Pflanzenzüchtung sind unterschiedliche Anwendungen der Agroinfiltration möglich. So kann das Verfahren ein interessantes Werkzeug sein, um Pflanzen auf mögliche Krankheitsresistenzen zu testen (Lusser et al. 2011, Schaart & Visser 2009). In diesen Fällen dient die Agroinfiltration der Selektion von Pflanzen, die für die weitere Züchtung verwendet werden können. Bei der Züchtung gentechnisch veränderter Pflanzen wiederum kann die Agroinfiltration dazu benutzt werden, mögliche Transgene vor einer stabilen Transformation im Pflanzengewebe zu testen (Leckie & Stewart 2011).

Die Agroinfiltration (insb. Agroinokulation/Agroinfektion) wird seit neuem auch als mögliches Werkzeug diskutiert für die RNA-dirigierte DNA-Methylierung (Abschnitt 3.4), die *Reverse Breeding* (Abschnitt 3.5), die Beschleunigte Züchtung (Abschnitt 3.6) sowie die NRE-Techniken<sup>2</sup> (Abschnitte 3.10, 3.11.1 und 3.11.2).

Neben der Pflanzenzüchtung kommt die Agroinfiltration auch in der Forschung und beim *Molecular Farming* zum Einsatz. In der Forschung wird die Agroinfiltration als Werkzeug der funktionalen Genomik oder zum Studium der Interaktionen zwischen Pflanze und Pathogenen eingesetzt (Lusser et al. 2011). Beim *Molecular Farming* wiederum wird die Agroinfiltration zur Herstellung von biopharmazeutischen Proteinen erprobt (z.B. Menassa et al. 2012, Circelli et al. 2010, Komarova et al. 2010).

### 3.1.3 Stand der Entwicklung

Agroinfiltration wird seit den 1980er Jahre in der Forschung eingesetzt. In der Literatur lassen sich entsprechend über 300 Publikationen zu entsprechenden Forschungsarbeiten finden (Lusser et al. 2011). In der Mehrheit der Fälle beschreiben die Veröffentlichungen Anwendungen in der Grundlagenforschung (Lusser et al. 2011). Was die möglichen Anwendungen in der Pflanzenzucht betrifft, so lassen sich in der Literatur Beispiele finden, in denen Agroinfiltration zur Herstellung

---

<sup>2</sup> Zu den NRE-Techniken gehören die Zinkfinger-Nukleasen-, die TALEN- und die Meganukleasen-Techniken. Sie beruhen alle auf dem Einsatz neuer Restriktionsenzyme (NRE).

rekombinanter Proteine (z.B. Pogue et al. 2010, Gomez et al. 2009) oder zur Selektion von krankheitsresistenten Pflanzen eingesetzt wird (z.B. Vleeshouwers et al. 2008, Zenna et al. 2006).

Eine im Jahr 2010 durchgeführte Umfrage bei Pflanzenzuchtunternehmen ergab, dass die befragten Firmen Agroinfiltration für Neuzüchtungen bei Raps, Kartoffeln und Kopfsalat einsetzen (Lusser et al. 2011).

#### **3.1.4 Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen**

Wird die Agroinfiltration als Selektionsverfahren eingesetzt, sind weder bei agroinfiltrierten Pflanzen noch bei deren Nachkommen genetischen Veränderungen beabsichtigt. In agroinfiltrierten Pflanzen hängt die beabsichtigte Wirkung vom eingeführten Genkonstrukt ab; je nach Konstrukt kann es zur Bildung eines neuen Proteins oder zur Stilllegung eines endogenen Gens kommen. Wird die Agroinfiltration als Selektionsverfahren eingesetzt, werden in den Nachkommen agroinfiltrierter Pflanzen keine neuen Wirkungen beabsichtigt.

#### **3.1.5 Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen**

Es ist nicht auszuschliessen, dass die T-DNA der Agrobakterien ins Erbgut der Pflanzenzellen integriert (Lusser et al. 2011, NTWG 2011, Schaart & Visser 2009). In diesen Fällen wäre die infiltrierte Pflanze eine Chimäre aus gentechnisch veränderten Zellen und unveränderten Zellen. Die Insertion der T-DNA dürfte hauptsächlich in den Pflanzenzellen stattfinden, die in unmittelbarer Umgebung der Infiltration liegen. Agrobakterien können sich jedoch innerhalb einer Pflanze auch ausbreiten (Puopolo et al. 2007, Cubero et al. 2006, Marti et al. 1999, Tarbah & Googman 1987). Es ist deshalb nicht gänzlich auszuschliessen, dass sich Agrobakterien von der Infiltrationsstelle fortbewegen und in Keimzellen oder andere Pflanzenteile gelangen, die für die weitere Vermehrung benutzt werden (Schaart & Visser 2009, COGEM 2006a). Falls es dort zu einer Insertion der T-DNA käme, könnte dies zu einer stabil transformierten Pflanze führen.

Wird die Agroinfiltration als Selektionsverfahren eingesetzt, sollten in Nachkommen, die frei von Agrobakterien und frei von T-DNA sowie chromosomaler DNA von Agrobakterien sind, in der Regel keine unbeabsichtigten Wirkungen auftreten. Eine Ausnahme könnten die Fälle sein, in denen RNAi-Konstrukte eingeführt werden und es zu Methylierung endogener Sequenzen kommt. Der mit der Methylierung zusammenhängende neue Phänotyp könnte stabil auf die Nachkommen weitervererbt werden (Schaart & Visser 2009).

#### **3.1.6 Sicherheitsaspekte**

Die Sicherheitsaspekte, die mit der Agroinfiltration verbunden sind, werden im Folgenden für die Nachkommen agroinfiltrierter Pflanzen dargestellt und zwar für den Fall, dass die Agroinfiltration als Selektionsverfahren eingesetzt wird. Bei der Agroinokulation und Agroinfektion sind neben den im Folgenden beschriebenen Aspekten auch die mit dem Einsatz viraler Vektoren verbundenen Sicherheitsaspekte zu berücksichtigen. Diese Aspekte werden im Abschnitt 3.2.6 erläutert.

Wird die Agroinfiltration als Selektionsverfahren eingesetzt, so dürften die Nachkommen agroinfiltrierter Pflanzen, in denen die Abwesenheit der rekombinanten Bakterien sowie die Abwesenheit der chromosomalen Agrobakterien-DNA und der T-DNA nachgewiesen sind, die gleichen Eigenschaften aufweisen wie die ursprünglich agroinfiltrierte Pflanze (Schaart & Visser 2009).

Eine Ausnahme könnten die Fälle sein, in denen RNAi-Konstrukte eingeführt werden und es zu Methylierung endogener Sequenzen kommt. Nachkommen könnten das neue Methylierungsmuster auch dann beibehalten, wenn sie die T-DNA nicht mehr besitzen. Unbeabsichtigte Methylierungen können auch spontan auftreten (Manning et al. 2006, Cubas et al. 1999), mit Gewebekultur-

techniken verbunden sein (Rhee et al. 2010, Krizova et al. 2009) oder mittels Chemikalien ausgelöst werden (Fieldes et al. 2005). Unbeabsichtigte Methylierungen treten deshalb bei anderen Züchtungsverfahren ebenfalls auf.

### **3.1.7 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden<sup>3</sup>**

*Erkennung:* Wird die Agroinfiltration als Selektionsverfahren eingesetzt, ist eine Erkennung von Nachkommen agroinfiltrierter Pflanzen nicht möglich, falls die Nachkommen frei von den eingeführten genetischen Konstrukten sind (Lusser et al. 2011, NTWG 2011).

*Identifikation:* Wird die Agroinfiltration als Selektionsverfahren eingesetzt, ist die Identifikation von Nachkommen agroinfiltrierter Pflanzen nicht möglich, falls die Nachkommen frei von den eingeführten genetischen Konstrukten sind (Lusser et al. 2011, NTWG 2011).

### **3.1.8 GVO-Klassierung**

Im Folgenden werden Aspekte diskutiert, die bei der GVO-Klassierung agroinfiltrierte Pflanzen und ihren Nachkommen eine Rolle spielen könnten und zwar für den Fall, dass die Agroinfiltration als Selektionsverfahren benutzt wird. Die Aspekte, die bei der GVO-Klassierung der Agroinokulation und Agroinfektion zusätzlich eine Rolle spielen könnten, sind in Abschnitt 3.2.8 erläutert.

Nachkommen agroinfiltrierter Pflanzen könnten in gewissen Fällen neue Methylierungsmuster aufweisen (siehe Abschnitt 3.1.5). Falls neue Methylierungen im Sinne der GVO-Legaldefinition als Veränderungen am genetischen Material gelten sollten (siehe dazu Abschnitt 3.4.8), könnte dies bei der GVO-Klassierung von Nachkommen agroinfiltrierter Pflanzen zu berücksichtigen sein.

Fragen zur GVO-Klassierung agroinfiltrierter Pflanzen können in der Praxis umgangen werden, indem jeweils auf die Weiterverwendung von Material der infiltrierten Pflanzen verzichtet wird und anstelle dessen Material von Pflanzen verwendet wird, die genetisch identisch zu den behandelten Pflanzen sind, aber selbst nicht mit rekombinanten Agrobakterien infiltriert wurden.

Eine Diskussion der GVO-Klassierung agroinfiltrierter Pflanzen und ihrer Nachkommen im Lichte der EU-Richtlinie 2001/18/EG findet sich in NTWG (2011) und ZKBS (2012).

#### *3.1.8.1 Agroinfiltrierte Pflanzen*

Agroinfiltrierte Pflanzen sind Pflanzen, die einen GVO (rekombinante Agrobakterien) enthalten, und deshalb dem Regelungsbereich der Einschliessungsverordnung (ESV) und FrSV unterliegen.

Ob die Pflanzen selbst auch als GVO zu klassieren sind, ist diskutierbar. Gegen eine GVO-Klassierung spricht der Umstand, dass die Agroinfiltration ohne Veränderung des Erbguts der Pflanze verlaufen kann. Für eine Klassierung als GVO könnte der Umstand sprechen, dass es zumindest in den direkt infiltrierten Geweben zu einer Integration der T-DNA ins Erbgut der Pflanze kommen kann (Abschnitt 3.1.4.2). Agroinfiltrierte Pflanzen sind somit potenziell Chimären, die aus genetisch unveränderten Zellen und Zellen mit inserierter T-DNA bestehen. Ob eine agroinfiltrierte Pflanze tatsächlich eine Chimäre ist, lässt sich erst im Nachhinein feststellen. Falls eine solche Chimäre gemäss FrSV als GVO gälte, könnte der potenzielle Chimären-Status dafür sprechen, agroinfiltrierte Pflanzen immer als GVO zu klassieren – also unabhängig davon, ob der Chimären-Status festgestellt worden ist oder nicht.

---

<sup>3</sup> Mit Erkennung ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte festzustellen und zwar in Bezug auf eine geeignete Vergleichssorte. Mit Identifikation wiederum ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte als Veränderung zu erkennen, die absichtlich durch ein bestimmtes Verfahren eingeführt worden ist.

### 3.1.8.2 Stecklinge agroinfiltrierter Pflanzen

Stecklinge, die direkt von agroinfiltrierten Pflanzen abstammen, können rekombinante Agrobakterien enthalten oder nicht; und sie können Chimäre aus gentechnisch veränderten Zellen und unveränderten Zellen sein oder nicht. Damit ergibt sich ein vergleichbarer Sachverhalt wie bei agroinfiltrierten Pflanzen selbst (siehe Abschnitt oben).

### 3.1.8.3 Samen agroinfiltrierter Pflanzen

Dass Samen agroinfiltrierter Pflanzen rekombinante Agrobakterien und/oder die T-DNA in ihrem Erbgut enthalten, gilt als unwahrscheinlich, ist aber nicht gänzlich auszuschließen (Abschnitte 3.1.5). Samen agroinfiltrierter Pflanzen könnten daher als potenzielle GVO oder als potenzielles Produkt, das einen GVO enthält, betrachtet werden. Ob die Samen tatsächlich GVO beziehungsweise ein GVO enthaltendes Produkt sind, liesse sich nur durch destruktive Methoden nachweisen. Wie die Samen agroinfiltrierter Pflanzen im Lichte von Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV zu beurteilen sind, könnte von den Antworten auf folgende Fragen abhängen: Wie soll mit der Nichtnachweisbarkeit und geringen Wahrscheinlichkeit umgegangen werden, dass die Samen rekombinante Agrobakterien und/oder T-DNA enthalten? Sollen die Samen als GVO zu klassieren sein? Oder kann aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit auf eine GVO-Klassierung verzichtet werden?

### 3.1.8.4 Nachkommen von Pflanzen aus Samen agroinfiltrierter Pflanzen

In Sprösslingen aus Samen agroinfiltrierter Pflanzen lässt sich nachweisen, ob noch rekombinante Agrobakterien vorhanden sind beziehungsweise ob DNA der rekombinanten Agrobakterien ins Erbgut der Pflanzen inseriert wurde. Ob Nachkommen von solchen Sprösslingen, die nachweislich kein fremdes Genmaterial mehr enthalten, als GVO zu klassieren sind, wird in der FrSV nicht konkret beantwortet. Hinsichtlich Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV lässt sich argumentieren, dass Nachkommen, die in ihrem Erbgut nachweisbar keine DNA der rekombinanten Agrobakterien besitzen, den Kriterien der GVO-Legaldefinition nicht entsprechen, weil sie im Vergleich zur Ausgangspflanze keine Veränderungen an ihrem genetischen Material aufweisen.

## 3.2. Virus-induziertes Gen-Silencing (VIGS)

Das Virus-induzierte Gen-Silencing (VIGS) ist ein Verfahren, in dem pflanzenvirale Vektoren dazu benutzt werden, die Expression von endogenen Pflanzengenen stillzulegen (Schaart & Visser 2009). Das Verfahren dient vor allem als Werkzeug für die funktionale Genomik und die Reverse Genetik (Di Stilio 2011, Purkayastha & Dasgupta 2009), wird aber auch bei der herkömmlichen sowie der Marker-unterstützten Züchtung eingesetzt (Senthil-Kumar & Mysore 2011b). Seit neuem wird VIGS zudem als Werkzeug diskutiert, um neue Sorten zu züchten (Senthil-Kumar & Mysore 2011b), insbesondere im Zusammenhang mit der RNA-dirigierten DNA-Methylierung (Kanazawa et al. 2011a/b; Abschnitt 3.4), dem *Reverse Breeding* (Dirks et al. 2009; Abschnitt 3.5) und der Beschleunigten Züchtung (Sasaki et al. 2011; Abschnitt 3.6).

### 3.2.1 Beschreibung des Verfahrens

VIGS nutzt rekombinante virale Vektoren für das Silencing von endogenen Pflanzengenen. Die viralen Vektoren werden dabei nicht in Keimzellen eingebracht, sondern in somatische Zellen. Eine stabile Transformation der Pflanzen wird somit nicht beabsichtigt.

VIGS basiert hauptsächlich auf dem pflanzeigenen Prozess des siRNA-vermittelten RNA-Silencing<sup>4</sup>. Bei diesem Prozess werden aus langer doppelsträngiger RNA (dsRNA) so genannte *small interfering RNAs* (siRNA) gebildet, die dazuführen, dass diejenigen mRNAs abgebaut werden, die Homologien zur dsRNA beziehungsweise siRNA aufweisen. Durch den Abbau der mRNA kommt es zum posttranskriptionellen Gen-Silencing (PTGS) der korrespondierenden Gene. Neben der Auslösung des PTGS ist es mit VIGS auch möglich, den pflanzeigenen Prozess der RNA-vermittelten DNA-Methylierung auszunutzen und damit ein transkriptionelles Gen-Silencing (TGS) zu bewirken (Kanazawa et al. 2011a/b, Otagaki et al. 2011, Jones et al. 1998). In diesen Fällen führen die siRNAs zur *de novo* Methylierung von Cytosinen und zwar in DNA-Regionen, die homolog zu den dsRNAs beziehungsweise siRNAs sind. Erfolgt die *de novo* Methylierung innerhalb von Promotor-Sequenzen, kann dies zum TGS des korrespondierenden Gens führen (Matzke et al. 2007, Eamens et al. 2008).

Um die oben beschriebenen Prozesse auszunutzen, werden beim VIGS Pflanzenviren so gentechnisch verändert, dass sie Teile der Sequenz desjenigen Pflanzengens (bzw. Promotors) besitzen, das stillgelegt werden soll. Werden solche rekombinanten Viren in die Pflanzenzellen eingebracht, kommt es durch die Replikation zur Bildung von dsRNA und damit zum PTGS oder TGS.

VIGS besteht hauptsächlich aus drei Schritten: (I) Herstellung der rekombinanten Vektoren, (II) Einschleusen der Vektoren in die Pflanze und (III) Silencing des Zielgens. Wird Material der behandelten Pflanze für die weitere Züchtung verwendet, folgt ein vierter Schritt, der darin besteht, den VIGS-Vektor zu entfernen.

Zur Herstellung der rekombinanten Vektoren können sowohl RNA- wie auch DNA-Pflanzenviren benutzt werden (Senthil-Kumar & Mysore 2011b, Purkayastha & Dasgupta 2009). Möglich ist auch der Einsatz von Satelliten-Viren (*satellite virus-induced silencing system*, SVISS; Gossele et al. 2002). Von Interesse sind insbesondere Viren beziehungsweise Vektoren, die in mehreren Pflanzenarten benutzt werden können und die schwach oder attenuiert sind, so dass sie wenige oder gar keine Krankheitssymptome in den Pflanzen auslösen.

Das Einschleusen der Vektoren in die Pflanzen kann mit verschiedenen Methoden gelingen, wobei die Wahl der Methode von der jeweiligen Pflanzenart und dem Vektor abhängt. Zu den möglichen Methoden gehören: biolistische Verfahren, die mechanische Inokulation von *in vitro* transkribierter RNA, die Inokulation von RNA aus Blattextrakten infizierter Pflanzen sowie die Agroinfektion und Agroinokulation (Stratmann & Hind 2011, Purkayastha & Dasgupta 2009, Robertson 2004). Bei den letzteren beiden Verfahren werden die viralen Vektoren in T-DNA-Vektoren eingebracht, welche dann zur Transformation von *A. tumefaciens* benutzt werden (siehe Abschnitt 3.1.1).

VIGS ist in den weitaus meisten Fällen vorübergehend und dauert üblicherweise 2 bis 16 Wochen an. Es kann jedoch auch während der ganzen Lebensspanne von Pflanzen anhalten und – falls der virale Vektor übertragen oder im Falle eines TGS – an Nachkommen übertragen werden (Senthil-Kumar & Mysore 2011a/b, Becker & Lange 2010).

Die Selektion von Virus-freien Nachkommen kann mit unterschiedlichen Methoden erfolgen, wobei die Wahl der Methode davon abhängt, wie die verwendete Pflanze sich fortpflanzt und ob der eingesetzte Virus via Samen übertragen werden kann oder nicht (Senthil-Kumar & Mysore 2011b, Schaart & Visser 2009). Bei vegetativ vermehrten Pflanzen kann die Elimination der Viren mit speziellen Techniken wie Thermotherapie, Kryotherapie und Meristemkultur gelingen (Senthil-Kumar & Mysore 2011b, Schaart & Visser 2009, Wang & Valkonen 2009/2008, Wang et al. 2008). Bei sexuell vermehrten Pflanzen können die Samen weiter verwendet werden, falls der eingesetzte

---

<sup>4</sup> Neuere Untersuchungen zeigen, dass VIGS nicht nur mit siRNAs gelingt, sondern auch mit miRNAs (Tang et al. 2010).

Virus nicht oder nicht hundertprozentig via Samen übertragen wird (Senthil-Kumar & Mysore 2011b, Schaart & Visser 2009).

### **3.2.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht**

VIGS wird mehrheitlich in der Grundlagenforschung eingesetzt und zwar als Werkzeug für die funktionale Genomik und die Reverse Genetik (Becker & Lange 2010, Purkayastha & Dasgupta 2009, Robertson 2004). Die Resultate aus dieser Forschung wiederum können Anwendung in der Pflanzenzucht finden. So lassen sich mittels VIGS Kandidatengene identifizieren, die entweder zur Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen oder in der Marker-unterstützten Züchtung eingesetzt werden können (Senthil-Kumar & Mysore 2011b). Diese indirekte Anwendungsmöglichkeit ist für die vorliegende Arbeit nicht relevant, da sie entweder eindeutig zu GVO-Produkten oder eindeutig zu nicht-GVO-Produkten führt.

Relevant sind hingegen die direkten Anwendungsmöglichkeiten. Eine davon ist die Identifikation von Zuchtlinien mit gewünschten Eigenschaften. Pflanzen, die mit Hilfe von VIGS identifiziert werden, könnten dabei direkt als Eltern für die Züchtung eingesetzt werden. Da beim VIGS keine Gene in das Erbgut von Keimbahnzellen eingefügt werden sollten und der eingesetzte virale Vektor nicht via Samen übertragen werden muss, könnten somit Sorten entstehen, die frei von rekombinanten Nukleinsäuren sind.

Drei weitere Anwendungsmöglichkeiten, die derzeit in der Literatur diskutiert werden, bestehen darin, VIGS als Werkzeug für die RNA-dirigierte DNA-Methylierung (Kanazawa et al. 2011a/b; siehe Abschnitt 3.4), das *Reverse Breeding* (Dirks et al. 2009, siehe Abschnitt 3.5) und die Beschleunigte Züchtung (Sasaki et al. 2011, Senthil-Kumar & Mysore 2011b; siehe Abschnitt 3.6) zu verwenden. In allen drei Fällen können Sorten hergestellt werden, welche den eingesetzten viralen Vektor nicht mehr enthalten.

### **3.2.3 Stand der Entwicklung**

VIGS ist Mitte der 1990er Jahre erstmals angewendet worden (Kumagai et al. 1995). Seither wurde das Verfahren stetig verfeinert und weiter entwickelt. Heute sind mehr als 30 verschiedene VIGS-Vektoren bekannt, die insgesamt an über 40 Pflanzenarten angewendet worden sind (Senthil-Kumar & Mysore 2011b).

Ob und in welchem Umfang VIGS derzeit in Pflanzenzuchtprogrammen zur Selektion von Elternpflanzen verwendet wird, geht aus den gesichteten Unterlagen nicht hervor.

Die Strategie, VIGS als Werkzeug für die Beschleunigte Züchtung, die RNA-dirigierte DNA-Methylierung und das *Reverse Breeding* zu verwenden, ist relativ neu (Kanazawa et al. 2011a/b, Sasaki et al. 2011, Senthil-Kumar & Mysore 2011b, Dirks et al. 2009) und dürfte deshalb noch in der Erprobungsphase sein (siehe dazu auch Abschnitte 3.4, 3.5 und 3.6).

### **3.2.4 Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen**

Wird VIGS als Selektionsverfahren eingesetzt, sind weder bei VIGS-behandelten Pflanzen noch bei deren Nachkommen genetische Veränderungen beabsichtigt. In VIGS-behandelten Pflanzen besteht die beabsichtigte Wirkung darin, endogene Pflanzengene vorübergehend stillzulegen. Wird VIGS als Selektionsverfahren eingesetzt, werden in den Nachkommen VIGS-behandelter Pflanzen keine neuen Wirkungen beabsichtigt.

### **3.2.5 Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen**

Integration von Sequenzen des viralen Vektors: Falls die viralen Vektoren via Agroinokulation oder Agroinfektion in Pflanzen eingeschleust werden, ist es nicht auszuschliessen, dass die VIGS-

Sequenzen ins Erbgut der Pflanzenzellen integriert wird (Schaart & Visser 2009; siehe Abschnitt 3.1.5). Werden die viralen Vektoren ohne Hilfe von Agrobakterien eingeschleust, dürfte eine Integration ins Erbgut der Pflanze unwahrscheinlich sein. Gänzlich auszuschliessen ist eine Integration jedoch nicht. Pflanzenviren integrieren zwar während ihres Infektionszyklus normalerweise nicht ins Pflanzengenom (Schaart & Visser 2009), Sequenzuntersuchungen zeigen aber, dass die Genome von Pflanzen virale Sequenzen aufweisen können – und zwar sowohl Sequenzen von DNA- wie auch von RNA-Pflanzenviren (Chiba et al. 2011, Liu et al. 2010a, Bertsch et al. 2009, Harper et al. 2002).

Somaklonale Variationen: Falls zur Elimination des viralen Vektors Methoden eingesetzt werden, die einen In-vitro-Schritt beinhalten, können in den Nachkommen somaklonale Variationen auftreten (z.B. Zucchi et al. 2002).

Unbeabsichtigte Methylierung: Es ist nicht auszuschliessen, dass VIGS RNA-dirigierte DNA Methylierungen induziert. Neue Methylierungsmuster können unter Umständen stabil an die Nachkommen weiter vererbt werden.

### **3.2.6 Sicherheitsaspekte**

Mögliche Sicherheitsaspekte, die mit dem VIGS-Verfahren verbunden sind, werden im Folgenden für die Nachkommen VIGS-behandelter Pflanzen dargestellt.

VIGS kann sowohl zu PGTS als auch TGS führen, wobei nur die durch TGS verursachte epigenetische Veränderung an die Nachkommen weitervererbt werden kann (siehe Abschnitt 3.2.2). Führt VIGS zu einem PGTS, so können Samen, die von VIGS-inokulierten Pflanzen stammen und nachweisbar frei von VIGS-DNA-Sequenzen und frei von VIGS-Viren sind, zu Pflanzen führen, die identisch mit der Ausgangspflanze vor der Inokulation des VIGS-Vektors sind (Schaart & Visser 2009). In diesen Fällen können die Nachkommen als gleich sicher gelten wie die Ausgangspflanze. Führt VIGS hingegen zu einem TGS, ob beabsichtigt oder nicht, so können die Nachkommen im Vergleich zur Ausgangspflanze eine neue epigenetische Veränderung und somit eine unterschiedliche Expression bestimmter Gene aufweisen. Epigenetische Veränderungen können sich neutral, negativ oder positiv auswirken. Vererbare epigenetische Veränderungen können auch durch Umweltfaktoren ausgelöst werden, weshalb sie bei herkömmlich gezüchteten Pflanzen spontan auftreten oder absichtlich herbeigeführt werden können (Eichten et al. 2011, Verhoeven et al. 2010, Manning et al. 2006).

Falls zur Elimination des viralen Vektors Methoden eingesetzt werden, die einen In-vitro-Schritt beinhalten, können in den Nachkommen somaklonale Variationen auftreten. Somaklonale Variationen können auch bei anderen Züchtungsverfahren vorkommen wie beispielsweise der In-vitro-Mutagenese. Zudem werden sie beim Zuchtverfahren der somaklonalen Selektion gezielt zur Herstellung neuer Sorten verwendet (Singh & Shetty 2011, Veilleux & Johnson 1998).

### **3.2.7 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden<sup>5</sup>**

Erkennung: In den gesichteten Materialien sind keine Angaben zur Erkennung von Nachkommen VIGS-behandelter Pflanzen gefunden worden. Wird VIGS als Selektionsverfahren eingesetzt, dürfte die Erkennung von Nachkommen VIGS-behandelter Pflanzen jedoch kaum möglich sein, wenn die Nachkommen frei von den ursprünglich während des Verfahrens eingeführten Sequenzen sind.

---

<sup>5</sup> Mit Erkennung ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte festzustellen und zwar in Bezug auf eine geeignete Vergleichssorte. Mit Identifikation wiederum ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte als Veränderung zu erkennen, die absichtlich durch ein bestimmtes Verfahren eingeführt worden ist.

*Identifikation:* In den gesichteten Materialien sind keine Angaben zur Identifikation von Nachkommen VIGS-behandelter Pflanzen gefunden worden. Wird VIGS als Selektionsverfahren eingesetzt, dürfte eine Identifikation von Nachkommen VIGS-behandelter Pflanzen jedoch kaum möglich sein, wenn die Nachkommen frei von den ursprünglich während des Verfahrens eingeführten Sequenzen sind.

### **3.2.8 Aspekte der GVO-Klassierung**

Im Folgenden wird diskutiert, ob VIGS-behandelte Pflanzen und ihren Nachkommen im Lichte von Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV als GVO gelten könnten – und zwar für den Fall, dass VIGS als Selektionsverfahren benutzt wird.

Nicht näher diskutiert wird, dass die Nachkommen VIGS-behandelter Pflanzen neue Methylierungsmuster aufweisen können (siehe Abschnitt 3.2.5). Falls neue Methylierungen im Sinne der GVO-Legaldefinition als Veränderungen am genetischen Material gelten würden (siehe dazu Abschnitt 3.4.8), könnte dies bei der GVO-Klassierung von Nachkommen VIGS-behandelter Pflanzen zu berücksichtigen sein.

Die Aspekte, die bei der GVO-Klassierung der Agroinokulation und Agroinfektion zusätzlich eine Rolle spielen könnten, sind in Abschnitt 3.1.8 erläutert.

Da der realistischste Weg, Virus-freie Nachkommen zu gewinnen, darin besteht, Samen von VIGS-behandelten Pflanzen zu verwenden, werden im Folgenden weder andere Wege zur Gewinnung Virus-freier Nachkommen (Thermotherapie, Kryotherapie und Meristemkultur) noch die Nutzung von Stecklingen diskutiert.

Die Frage der GVO-Klassierung von VIGS-behandelten Pflanzen kann in der Praxis umgangen werden, indem jeweils auf die Weiterverwendung von Material aus VIGS-behandelten Pflanzen verzichtet wird und anstelle dessen Material von Pflanzen weiter verwendet wird, die genetisch identisch zur VIGS-behandelten Pflanze sind, aber selbst nicht mit rekombinanten Viren infiziert wurden.

#### *3.2.8.1 VIGS-behandelte Pflanzen*

VIGS-behandelte Pflanzen sind Pflanzen, die einen GVO (rekombinante Viren) enthalten, und deshalb dem Regelungsbereich der ESV und FrSV unterliegen. Ob die Pflanzen selbst auch als GVO zu klassieren sind, ist diskutierbar. Schliesst man aus, dass die viralen Vektoren oder Teilsequenzen davon in den inokulierten Pflanzen ins Erbgut integrieren, so bleibt das Erbgut der Pflanze unverändert. Da die Pflanze somit keine Veränderung an ihrem genetischen Material aufweist, lässt sich argumentieren, dass sie nach Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV kein GVO ist. Falls eine Integration von Vektor-Sequenzen nicht gänzlich ausgeschlossen wird, wären VIGS-behandelte Pflanzen als potenzielle Chimären zu betrachten, die aus genetisch unveränderten Zellen und Zellen mit inserierter T-DNA bestehen könnten. Ob eine VIGS-behandelte Pflanze tatsächlich eine Chimäre ist, lässt sich erst im Nachhinein feststellen. Falls eine solche Chimäre gemäss FrSV als GVO gälte, könnte der potenzielle Chimären-Status dafür sprechen, VIGS-behandelte Pflanzen immer als GVO zu klassieren – also unabhängig davon, ob der Chimären-Status festgestellt worden ist oder nicht.

#### *3.2.8.2 Samen VIGS-behandelter Pflanzen*

Um via Samen Virus-freie Nachkommen zu gewinnen, können beim VIGS-Verfahren entweder Viren eingesetzt werden, die nachweislich nicht Samen-übertragbar sind, oder Viren, die nur zu einem gewissen Prozentsatz via Samen übertragen werden. Im ersten Fall dürften die unter 3.2.8.3 diskutierten Aspekte eine Rolle spielen. Im zweiten Fall könnten die Samen als potenzielles



Produkt, das einen GVO enthält, betrachtet werden. Ob die Samen tatsächlich ein GVO enthaltendes Produkt sind, liesse sich nur durch destruktive Methoden beziehungsweise erst in den aus den Samen gewachsenen Sprösslingen nachweisen.

### 3.2.8.3 Nachkommen von Pflanzen aus Samen VIGS-behandelter Pflanzen

In Sprösslingen aus Samen VIGS-behandelter Pflanzen lässt sich nachweisen, ob noch rekombinante Viren vorhanden sind beziehungsweise ob DNA des Vektors ins Erbgut der Pflanzen inseriert wurde. Ob Nachkommen aus solchen Sprösslingen, die nachweislich kein fremdes Genmaterial mehr enthalten, als GVO zu klassieren sind, wird in der FrSV nicht konkret beantwortet. Hinsichtlich Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV lässt sich argumentieren, dass Nachkommen, die in ihrem Erbgut nachweisbar keine DNA aus den rekombinanten Viren besitzen, den Kriterien der GVO-Legaldefinition nicht entsprechen, weil sie im Vergleich zur Ausgangspflanze keine Veränderungen an ihrem genetischen Material aufweisen.

## 3.3 Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese (ODM)

Die Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese (ODM) ist ein Verfahren, bei dem synthetische Oligonukleotide in lebende Zellen eingeführt werden, um an definierten Stellen eines Episoms oder Chromosoms neue Mutationen einzuführen oder vorhandene Mutationen zu korrigieren (Lusser et al. 2012, 2011, Breyer et al. 2009, Iida & Terada 2005, Oh & May 2001).

ODM ist ein generischer Begriff, der für verschiedene Ansätze und Anwendungen steht. In der wissenschaftlichen Literatur werden eine Reihe verschiedener Namen für die ODM verwendet<sup>6</sup> (Lusser et al. 2011, Breyer et al. 2009).

Nicht der ODM zugerechnet werden Züchtungsverfahren, in denen Oligonukleotide mit inkorporierten Mutagenzien oder zusammen mit Zinkfinger-Nukleasen verwendet werden (ACRE 2011, Breyer et al. 2009; siehe dazu auch Abschnitte 3.10 und 3.11.6).

### 3.3.1 Beschreibung des Verfahrens

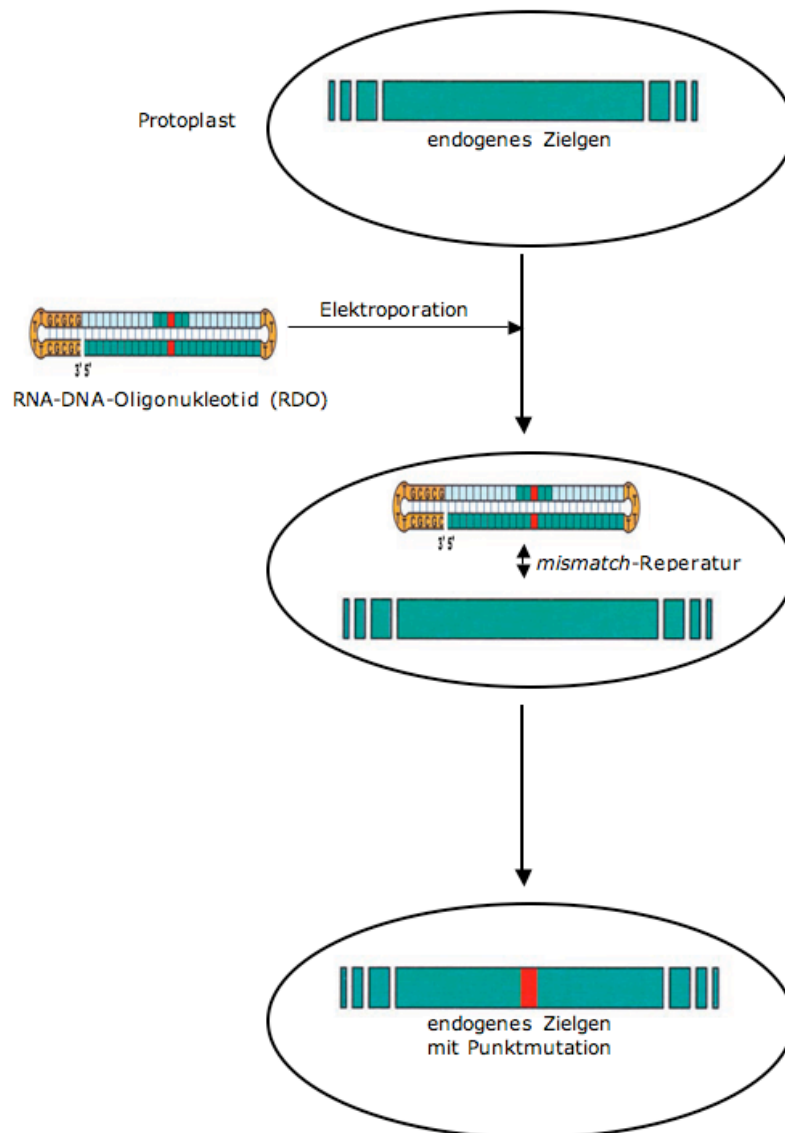
Mit der ODM lassen sich gezielt Mutationen in einem bis maximal vier aneinander liegenden Nukleotiden einer endogenen DNA-Sequenz einführen (Lusser et al. 2011). Die Mutation kann dabei zur Substitution, Insertion oder Deletion eines Nukleotids führen und Promotor- oder Gensequenzen betreffen. Die Auslösung der Mutation erfolgt durch die Zugabe von Oligonukleotiden (Oligos). Diese Oligos werden synthetisch hergestellt und weisen – abgesehen von den auszutauschenden Nukleotiden – Homologien zur Zielsequenz auf. Die Mutationen erfolgen, so wird vermutet, durch den zelleigenen Genreparaturmechanismus (Lusser et al. 2011, COGEM 2010, Connor 2010, Iida & Terada 2005). Was das Schicksal der Oligos betrifft, so wird erwartet, dass die zugefügten Oligos nicht ins Erbgut integrieren, sondern innerhalb der Zelle abgebaut werden.

Die Oligos, die bei der ODM eingesetzt werden, sind synthetisch hergestellte, 20 bis 100 Basen beziehungsweise Basenpaare lange Nukleinsäuren (Lusser et al. 2011, Connor 2010). Für die Mutagenese von Pflanzenzellen werden vorwiegend zwei Typen von Oligos verwendet: RNA-DNA-Oligonukleotide (RDO; Abbildung 2) oder einzelsträngige DNA-Oligonukleotide (Lusser et al.

---

<sup>6</sup> Zu diesen Namen gehören: *targeted nucleotide exchange*, *targeted gene repair*, *targeted gene correction*, *chimeraplasty*, *genoplasty*, *oligonucleotide-mediated gene editing*, *chimeric oligonucleotide-dependent mismatch repair*, *oligonucleotide-mediated gene repair*, *triplex-forming oligonucleotide-induced recombination*, *oligodeoxynucleotide-directed gene modification*, *therapeutic nucleic acid repair approach*, *RNA-mediated DNA modification*, *RNA-templated DNA repair*, *induced targeted mutagenesis*, *chimeric oligonucleotide dependent mismatch repair* (Lusser et al. 2011, Beyer et al. 2009a).

2011). Weitere Typen, die ebenfalls benutzt werden könnten, sind: RNA-Oligonukleotide, Tripelhelix formende Oligonukleotide (TFO) sowie Oligos mit chemisch modifizierten Nucleinsäuren wie beispielsweise Peptid-Nucleinsäuren (PNA) oder so genannten *locked* Nucleinsäuren (LNA) (COGEM 2010, Connor 2010, Breyer et al. 2009).



**Abbildung 2:** Vereinfachte schematische Darstellung des ODM-Verfahrens für den Fall, dass RNA-DNA-Oligonukleotide (RDO) in Protoplasten eingefügt werden. Farbcode des RDO: grün = DNA-Sequenzen, die homolog zum Zielgen sind; hellgrün = RNA-Sequenzen, die homolog zum Zielgen sind; rot = *mismatch*; orange = Schleifen aus Thymidin und «GC-Klemmen». Verändert nach Hohn & Puchta (1999).

Das Einführen der Oligos in lebende Zellen ist mit verschiedenen Methoden möglich. Dazu gehören: biolistische Verfahren, Elektroporation, PEG-vermittelte Transfektion, Mikroinjektion und Lipofektion (Mikroverkapselung). Die Wahl der Methode hängt dabei unter anderem davon ab, in welche Zellen die Oligos eingebracht werden sollen. Bei Pflanzen werden üblicherweise die Elektroporation sowie biolistische Verfahren eingesetzt (Okuzaki & Toriyama 2004, Kochevenko & Will-

mitzer 2003, Zhu et al. 2000, Beetham et al. 1999). Unabhängig von der Wahl der Methode erfolgt das Einführen der Oligos in die Zellen ohne Vektorsysteme.

### **3.3.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht**

Da sich mit der ODM spezifische Mutationen in Gensequenzen oder anderen DNA-Sequenzen einer Pflanze einfügen lassen, können folgende Veränderungen vorgenommen werden: Modifikation der Aminosäuresequenz eines Proteins, Ausschalten eines Gens (durch die Einführung von Stop-Codons oder Leserahmenverschiebungen) oder Veränderung der Expression eines Gens (durch Mutationen in der Promotorsequenz). Anders ausgedrückt: Mit der ODM lassen sich innerhalb der Pflanze unerwünschte Gene stilllegen, nützliche Gene aktivieren oder effizientere Proteine/Enzyme herstellen.

Die Anwendungsmöglichkeiten der ODM sind vergleichbar mit der klassischen Mutagenese, wobei die ODM den bedeutenden Vorteil bietet, Mutationen ortsspezifisch auslösen zu können. Im Vergleich zu klassischer Mutagenese treten bei der ODM deshalb auch weniger unbeabsichtigte Veränderungen im Erbgut auf (ACRE 2011, Lusser et al. 2011, COGEM 2010, Breyer et al. 2009, BAC 2007).

Zu den Eigenschaften, die sich mit ODM in Sorten einbringen lassen könnten, gehören unter anderem: Herbizidtoleranz, Schädlings- und Krankheitsresistenz, Toleranz gegenüber abiotischem Stress, verlängerte Haltbarkeit sowie veränderte Stärke- und Ölzusammensetzung (Lusser et al. 2011, Breyer et al. 2009).

### **3.3.3 Stand der Entwicklung**

Obwohl bereits Ende der 1990er Jahre gezeigt wurde, dass die ODM bei Pflanzen möglich ist (Beetham et al. 1999, Zhu et al. 1999), finden sich in der Literatur relativ wenige Veröffentlichungen über das Mutationsverfahren. Erprobt wurde ODM bisher bei Raps, Reis, Mais, Weizen, Banane und der Modellpflanze Arabidopsis, wobei die Forschenden entweder Fehler in Markergenen korrigierten oder pflanzeigene Gene so veränderten, dass die Pflanzen herbizidtolerant wurden (Dong et al. 2006, Okuzaki & Toriyama 2004, Kochevenko & Willmitzer 2003, Ruitter et al. 2003, Gamper et al. 2000, Kmiec et al. 2001, Rice et al. 2000, Zhu et al. 2000, 1999, Beetham et al. 1999).

Mindestens zwei Firmen existieren, die das ODM-Verfahren als technologische Plattform anbieten: Die US-amerikanische Firma Cibus hat das RTDS™-System (*Rapid Trait Development System*) entwickelt und die niederländische Firma Keygene die Keybase™-Technologie. Beide Firmen arbeiten dabei auch mit grossen Pflanzenzüchtungsunternehmen zusammen. Dass die Unternehmen an der Anwendung der ODM interessiert sind, zeigt auch eine im Jahr 2010 durchgeführte Umfrage, in der vier der befragten Unternehmen angaben, ODM einzusetzen (Lusser et al. 2011). Wie die Umfrage des Weiteren zeigt, ist insbesondere die Entwicklung herbizidtoleranter Raps- und Maissorten weit fortgeschritten. Herbizidtolerante Rapsorten könnten im Jahr 2013 auf den Markt kommen (Cibus 2009).

### **3.3.4 Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen**

Die beabsichtigte genetische Veränderung einer ODM-Sorte besteht in einer gezielten Mutation einer vorbestimmten endogenen DNA-Sequenz. Die Mutation kann ein bis maximal vier Basen betreffen (Lusser et al. 2011) und dazu führen, dass Basen ausgetauscht, entfernt oder hinzugefügt werden. Die in einer ODM-Sorte beabsichtigte Wirkung wird davon bestimmt, welche Zielsequenz wie verändert worden ist.

### 3.3.5 Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen

Mögliche unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen in einer ODM-Sorte sind:

Ungenau Veränderung der Zielsequenz: Die Mutation an der Zielsequenz kann ungenau sein (Iida & Terada 2005).

Insertionsmutationen: Falls DNA-Oligos verwendet werden, ist nicht gänzlich auszuschliessen, dass die Oligos ins Erbgut der Pflanze integrieren und damit Insertionsmutationen auslösen (Schaart & Visser 2009).

Ungezielte Mutationen: Es ist nicht auszuschliessen, dass die eingeführten Oligos auch in anderen als den Zielsequenzen Mutationen auslösen (ACRE 2011, COGEM 2010, 2006a, BAC 2007).

Somaklonale Variationen: Da die ODM einen In-vitro-Selektions- und Regenerationsschritt beinhaltet, kann es im Erbgut der mutierten Pflanze zu somaklonalen Variationen kommen. Somaklonale Variationen umfassen sowohl genetische wie auch epigenetische Veränderungen im Erbgut und können bei allen aus In-vitro-Kulturen regenerierten Pflanzen auftreten (Bairu et al. 2011). Zu den möglichen genetischen Veränderungen, die in aus In-vitro-Kulturen regenerierten Pflanzen beobachtet werden können, gehören Änderungen in der Chromosomenzahl und -struktur, Basensubstitutionen, Indels und Insertionsmutationen durch die Aktivierung von transponierbaren Elementen (Neelakandan & Wang 2012, Jiang et al. 2011, Jain 2001). Das Ausmass der Veränderungen kann von einer Reihe von Faktoren abhängen wie beispielsweise dem Genotypen, dem In-vitro-System, der Genomgrösse, dem Alter der Kultur und den Wachstumshormonen im Nährmedium (Bairu et al. 2011).

### 3.3.6 Sicherheitsaspekte

Im Folgenden werden Aspekte aufgeführt, die bei der Bewertung der Sicherheit von ODM-Sorten eine Rolle spielen könnten. Es wird kein Anspruch darauf erhoben, alle möglichen und denkbaren sicherheitsrelevanten Aspekte zu behandeln.

Bildung neuer Proteine: Mit der ODM lassen sich Mutationen in einer kodierenden Sequenz einführen, die zu einer beabsichtigten Veränderung die Aminosäuresequenz eines Proteins führen. Diese Veränderung kann unter Umständen neben den beabsichtigten Wirkungen auch unbeabsichtigte Wirkungen verursachen.

Erhöhung der Genexpression: Mit der ODM lassen sich Mutationen in regulatorischen Elementen einfügen, was zu einer Erhöhung der Expression des Zielgens führen kann. Falls das Expressionsniveau des Zielgens ausserhalb der Bandbreite zu liegen kommt, die innerhalb der Art natürlicherweise gefunden wird, fehlen Erfahrungen zur Sicherheit der gebildeten Menge. Ob das Expressionsniveau des Zielgens sicherheitsrelevant werden kann oder nicht, hängt unter anderem von seiner Höhe sowie vom gebildeten Protein ab.

Ungenau Veränderungen der Zielsequenz: Inwiefern eine ungenaue Veränderung der Zielsequenz unerwünschte Folgen haben könnte, ist im Einzelfall zu beurteilen. Mit den gängigen molekularen Methoden lassen sich unbeabsichtigte Veränderungen in der Zielsequenz entdecken, womit es möglich ist, die entsprechenden Pflanzen während des Züchtungsprozesses auszusortieren.

Insertion der Oligos: Da beim ODM-Verfahren keine integrativen Vektoren zum Einsatz kommen, dürfte die Wahrscheinlichkeit gering sein, dass die eingeführten Oligos ins Erbgut eingebaut werden und damit zu Insertionsmutationen führen. Je nach Typ des eingesetzten Oligos sollten etwaige Pflanzen, die inserierte Oligos aufweisen, mittels geeigneter Methoden zu entdecken sein, weshalb sie während des Züchtungsprozesses aussortiert werden können (Schaart & Visser 2009).

Ungezielte Mutationen: Unbeabsichtigte Mutationen ausserhalb der Zielsequenz können ineffektiv bleiben, unerwünschte Wirkungen verursachen oder erwünschte Auswirkungen haben. Mit den

gängigen Nachweismethoden lassen sich ungezielte Mutationen nur schwer ermitteln (ACRE 2011). Inwieweit Pflanzen mit unbeabsichtigten genetischen Veränderungen ausserhalb der Zielsequenz während des Züchtungsprozesses aussortiert beziehungsweise weiterverwendet werden, hängt von verschiedenen Faktoren ab, so unter anderem von der Manifestation der Veränderungen sowie der Wahl der Selektionsmethoden. Ungezielte Mutationen treten auch bei anderen Züchtungsverfahren auf, zum Beispiel bei der somaklonalen Selektion oder bei der klassischen Mutagenese. Im Vergleich zur klassischen Mutagenese treten bei der ODM ungezielte Mutationen weniger häufig auf (ACRE 2011, Lusser et al. 2011, COGEM 2010, Breyer et al. 2009, BAC 2007). Werden die Oligos und das experimentelle Protokoll sorgfältig designt, lösen die Oligos kaum Veränderungen ausserhalb der Zielsequenz aus (Lusser et al. 2011).

Somaklonale Variationen: Somaklonale Variationen können effektlos bleiben und erwünschte Auswirkungen haben. Sie können aber auch unerwünschte Wirkungen verursachen und somit sicherheitsrelevant sein. Inwieweit Pflanzen mit unerwünschten somaklonalen Variationen während des Züchtungsprozesses aussortiert beziehungsweise weiterverwendet werden, hängt ab von der Manifestation der Veränderungen sowie der Wahl der Selektionsmethoden. Somaklonale Variationen können auch bei anderen Züchtungsverfahren auftreten wie beispielsweise der In-vitro-Mutagenese. Zudem werden sie beim Zuchtverfahren der somaklonalen Selektion gezielt zur Herstellung neuer Sorten verwendet (Singh & Shetty 2011, Veilleux & Johnson 1998).

### **3.3.7 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden<sup>7</sup>**

Erkennung: Eine Mutation, die mit der ODM ins Erbgut von Pflanzen eingefügt worden ist, lässt sich mit gängigen Methoden erkennen, falls Informationen zu den Nukleotiden in der Nachbarschaft der Mutation vorliegen. Ohne diese Information lässt sich die Mutation nicht erkennen (Lusser et al. 2011).

Identifikation: Pflanzen, die mit dem ODM-Verfahren entwickelt worden sind, lassen sich nicht eindeutig als solche identifizieren, da sie sich auf molekularer Ebene nicht von Pflanzen unterscheiden, bei welchen dieselbe Mutation durch klassische Mutationszüchtung erzeugt worden ist (ACRE 2011, Lusser et al. 2011, COGEM 2010). Mittels ODM erzielte Mutationen sind zudem auch nicht zu unterscheiden von spontanen Mutationen oder Einzelnukleotid-Polymorphismen (ACRE 2011, Lusser et al. 2011).

### **3.3.8 Aspekte der GVO-Klassierung**

Im Folgenden werden Aspekte diskutiert, die bei GVO-Klassierung von Sorten aus der ODM eine Rolle spielen könnten und zwar für den Fall, dass die Sorten nachweisbar frei von während des Züchtungsprozesses extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen sind.

Eine Diskussion der GVO-Klassierung von Sorten aus der ODM im Lichte der EU-Richtlinie 2001/18/EG findet sich in ZKBS (2012), ACRE (2011), NTWG (2011) und BAC (2007).

#### *3.3.8.1 ODM im Lichte von Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV*

Sorten, die aus der ODM hervorgehen, weisen Veränderungen am genetischen Material auf, die weder durch Kreuzen noch durch natürliche Rekombination entstanden sind, sondern technisch erzeugt wurden. Aus einer Prozess-bezogenen Sichtweise liesse sich somit argumentieren, dass die Sorten als GVO zu klassieren sind. Aus einer Produkt-bezogenen Sichtweise lässt sich wiederum

---

<sup>7</sup> Mit Erkennung ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte festzustellen und zwar in Bezug auf eine geeignete Vergleichssorte. Mit Identifikation wiederum ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte als Veränderung zu erkennen, die absichtlich durch ein bestimmtes Verfahren eingeführt worden ist.

argumentieren, dass die Sorten Veränderungen am genetischen Material aufweisen, die auch auf natürliche Weise entstehen könnten, weshalb sie nicht als GVO zu klassieren sein sollten.

Unabhängig von den beiden Perspektiven lässt sich fragen, ob die ODM gemäss FrSV als gentechnisches Verfahren einzustufen ist oder nicht.

Die ODM dürfte kein gentechnisches Verfahren gemäss Anhang 1 Abs. 1 Bst. a FrSV sein, weil das Einführen der Oligos in die Protoplasten ohne Vektorsysteme erfolgt.

Ob die ODM gemäss Anhang 1 Abs. 1 Bst. b FrSV als gentechnisches Verfahren einzustufen ist oder nicht, ist hingegen unklar und lässt sich unterschiedlich interpretieren. Die Interpretationen hängen dabei von den Antworten auf folgende beiden Fragen ab: Sind Oligos gemäss FrSV «genetisches Material»? Kann ein Verfahren gemäss Anhang 1 Abs. 1 Bst. b FrSV auch dann ein gentechnisches Verfahren sein, wenn es nicht zur Insertion von eingeführten Nukleinsäuren kommen kann?

In der FrSV wird der Begriff «genetisches Material» nicht konkretisiert, weshalb er offen für Interpretationen ist. Eine Legaldefinition findet sich hingegen in Art. 2 des Übereinkommens über die biologische Vielfalt. Dort steht, dass jedes Material pflanzlichen, tierischen, mikrobiellen oder sonstigen Ursprungs, das funktionale Erbinheiten enthält, genetisches Material ist. Ob diese Definition auch im Hinblick auf Anhang 1 Abs. 1 Bst. b FrSV anwendbar ist, ist hier unklar.

In der ehemaligen EU-Richtlinie 90/220, die als Vorlage für Anhang 1 FrSV diente, wird nicht der Begriff «genetisches Material» verwendet, sondern die Begriffe «heritable material» (englische Fassung) beziehungsweise «Erbgut» (deutsche Fassung). Eine mögliche Interpretation des Begriffs «genetisches Material» ist somit, ihn mit erblichem Material, Erbmaterial oder Erbgut gleichzusetzen. Bezüglich der ODM von Pflanzen könnte diese Interpretation beispielsweise bedeuten, dass nur Oligos aus DNA nicht aber RNA-Oligos als genetisches Material gelten, da das Erbmaterial von Pflanzen aus DNA besteht.

Wird der Begriff «genetisches Material» den Begriffen «heritable material» oder «Erbgut» gleichgestellt, ergeben sich hinsichtlich der Frage, ob Oligos genetisches Material sind, zwei weitere Interpretationsmöglichkeiten. In der einen Interpretation wären Oligos nur dann genetisches Material, wenn sie ins Erbgut integrieren und somit tatsächlich vererbbar sind. In der anderen Interpretation können die Oligos auch dann genetisches Material sein, wenn sie nicht ins Erbgut inserieren (siehe dazu NTWG 2011). Im Sinne der FrSV dürfte eher die letztere Interpretation sein. Da in Art. 3 Abs. 1 Bst. b FrSV genetisches Material, das biologisch aktiv ist, Mikroorganismen gleichgestellt wird, ist davon auszugehen, dass auch freie Nukleinsäuren und somit Oligos im Sinne der FrSV als «genetisches Material» gelten können.

Eine ausführliche Diskussion des Status von Oligos im Zusammenhang mit der ODM findet sich in COGEM (2010).

#### *3.3.8.1 ODM im Lichte von Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV*

Da die ODM eine neue Art von Mutagenese ist, ist sie – wie oben bereits erwähnt – auch hinsichtlich Anhang 1 Abs. 3 Bst. a FrSV zu diskutieren. Dort wird festgehalten, dass die Mutagenese an sich kein gentechnisches Verfahren und die resultierenden Sorten somit nicht als GVO reguliert werden. Diese Bestimmung gilt jedoch dann nicht, wenn die Mutagenese mit dem Einsatz von rekombinanten Nukleinsäuremolekülen oder von GVO verbunden ist.

Inwiefern die in der ODM eingesetzten Oligos als rekombinante Nukleinsäuremoleküle gelten, kann hier nicht abschliessend beantwortet werden. Weder in der FrSV noch in anderen Rechtsvorschriften der Schweiz findet sich eine Legaldefinition des Begriffs. Im erläuternden Bericht zur FrSV wird

anstelle von «rekombinante Nukleinsäuremoleküle» auch der Ausdruck «gentechnisch veränderte DNA-Abschnitte» verwendet (EDI 1997).

In der Wissenschaft gibt es keine allgemein gültige Definition. Der Begriff wird dort unterschiedlich interpretiert, weshalb sich mehrere Beschreibungen mit verschiedenen Nuancen finden lassen (COGEM 2010).

Da sowohl eine rechtliche wie wissenschaftliche Definition fehlen, wird es interpretierbar, ob Oligos rekombinante Nukleinsäuren sind oder nicht. Im Folgenden werden einige mögliche Interpretation vorgestellt. Eine vertiefte Diskussion unterschiedlicher Sichtweisen findet sich bei COGEM (2010).

Semantisch betrachtet kann der Begriff «rekombinant» so verstanden werden, dass zwei oder mehr DNA- beziehungsweise RNA-Abschnitte kombiniert werden müssen, damit eine Nukleinsäure als rekombinant betrachtet werden kann. Da die Oligos synthetische aus einzelnen Nukleotiden hergestellt werden, findet in diesem Sinne keine Neukombination von Strängen statt, weshalb synthetische hergestellte Oligos keine rekombinanten Nukleinsäuren wären.

Diskutierbar ist des Weiteren, ob der Begriff «rekombinant» hinsichtlich der verschiedenen Typen von Oligos unterschiedlich zu interpretieren ist. So könnten Oligos, die nur aus DNA bestehen, als nicht rekombinant betrachtet werden. Oligos hingegen, die sowohl DNA wie RNA enthalten, könnten als rekombinant gelten, da sie zwei unterschiedliche Nukleinsäuren kombinieren.

In einer weiteren Sichtweise spielt es eine Rolle, ob die in die Zellen eingeführten Oligos ins Erbgut integriert werden oder nicht. So könnten Oligos, die ohne zu integrieren nur vorübergehend in der Zelle sind, als chemische Mutagenzien betrachtet werden und nicht als rekombinante Nukleinsäuren.

### **3.4 RNA-dirigierte DNA-Methylierung (RdDM)**

Als RNA-dirigierte DNA-Methylierung (RdDM) wird ein Pflanzenzüchtungsverfahren bezeichnet, bei dem gentechnische Methoden eingesetzt werden, um bestimmte genomische Sequenzabschnitte gezielt zu methylieren und damit die Expression endogener Gene zu modifizieren. Da die gentechnischen Methoden allein für die Auslösung der Methylierung notwendig sind, nicht aber zwingend für den Erhalt des neuen Methylierungsmusters, können sich mit RdDM Sorten entwickeln lassen, die frei von extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen sind (Lusser et al. 2012, 2011, Kanazawa et al. 2011a/b, Wassenegger et al. 2010, COGEM 2006a, Eamens et al. 2008, Wang & Waterhouse 2001).

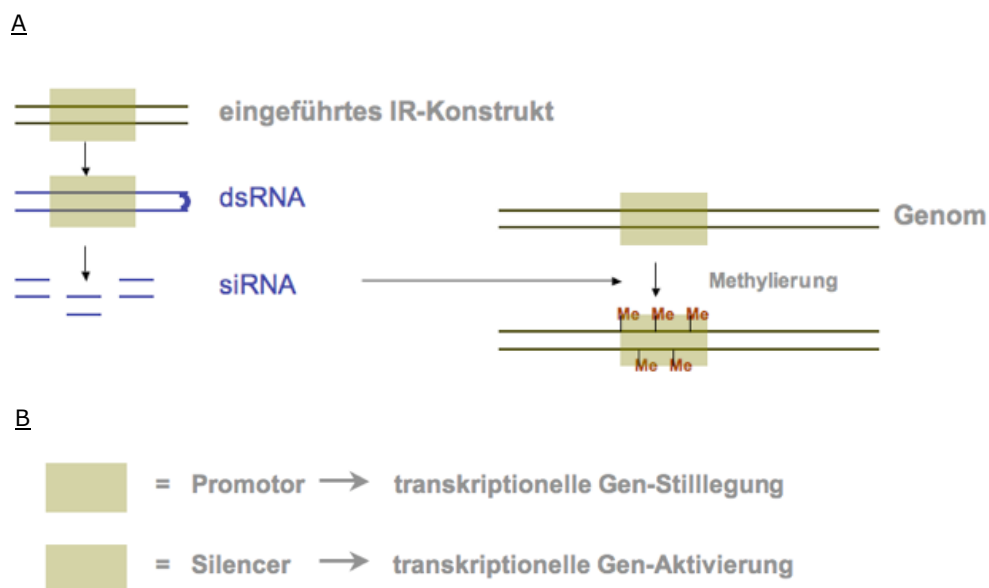
Das RdDM-Verfahren kann dem *epigenetic engineering* (Nap 2010, Nap & van Kessel 2006) oder dem *transgenic construct driven breeding* (Lusser & Rodriguez-Cerezo 2012) zugerechnet werden.

#### **3.4.1 Beschreibung des Verfahrens**

Das RdDM-Verfahren beruht, wie es der Name bereits beinhaltet, auf dem in Pflanzen vorkommenden Prozess der RNA-dirigierten DNA-Methylierung. Bei diesem Prozess werden aus doppelsträngiger RNA (dsRNA) so genannte *small interfering RNAs* (siRNA) gebildet, welche zur *de novo* Methylierung von Cytosinen führen und zwar in DNA-Regionen, die homolog zu den dsRNAs beziehungsweise siRNAs sind (Matzke et al. 2007; Abbildung 3). Erfolgt die *de novo* Methylierung innerhalb von Promotor-Sequenzen, kann dies zum transkriptionellen Gen-Silencing (TGS) und damit zur teilweisen oder vollständigen Inaktivierung des korrespondierenden Gens führen (Eamens et al. 2008, Matzke et al. 2007). Findet die Methylierung innerhalb einer Sequenz eines Silencers statt, kann dies eine transkriptionelle Aktivierung, also eine gesteigerten Expression des korrespondierenden Gens bewirken (Shibuya et al. 2009). Die auf diesen Wegen *de novo* erzeug-

ten Methylierungen können meiotisch stabil sein und deshalb an Nachkommen weitervererbt werden.

Da es mit Hilfe gentechnischer Methoden möglich ist, den pflanzeigenen Mechanismus der DNA-Methylierung auszulösen und zu lenken, kann der oben beschriebene RdDM-Prozess zur Züchtung neuer, epigenetisch modifizierter Sorten ausgenutzt werden. Um beim RdDM-Verfahren die DNA-Methylierung auszulösen, werden gegenwärtig vier verschiedene gentechnische Strategien erprobt und/oder diskutiert: Transformation, Transfektion, VIGS und Pfropfen mit GV-Reiser beziehungsweise GV-Wurzelstock (Lusser et al. 2011, Kanazawa et al. 2011a/b, Bai et al. 2011). Gemäss NTWG (2011) ist es auch denkbar, die DNA-Methylierung direkt durch das Einführen von siRNA auszulösen – sei es in Liposomen oder als an Proteine kovalent gebundene nackte RNA. Diese Strategie wird im Folgenden nicht weiter behandelt, da in der Literatur keine entsprechenden Beispiele bei Pflanzen gefunden worden sind.



**Abbildung 3:** **A:** Vereinfachte schematische Darstellung der RdDM. Um die RdDM auszulösen werden genetische Konstrukte (IR-Konstrukte oder *hairpin*-Konstrukte) in Pflanzenzellen eingebracht, die Homologien zur Zielsequenz aufweisen und so strukturiert sind, dass sie in eine dsRNA transkribiert werden. Die dsRNA wird von der Zelle in so genannte siRNAs zerlegt, welche wiederum dazu führen, dass bestimmte Proteine der Zelle die Zielsequenz methylieren. **B:** Konsequenzen einer Methylierung. Erfolgt die Methylierung in einer Promotorsequenz, kommt es zur vollständigen oder teilweisen Stilllegung der Transkription des korrespondierenden Gens. Erfolgt die Methylierung in einem Silencer, kann sich die Transkriptionsrate des korrespondierenden Gens erhöhen.

#### 3.4.1.1 Induktion der RdDM mittels Transformation von IR-Konstruktion

Dieser Ansatz basiert darauf, das Erbgut einer ausgewählten Sorte mit einem «*inverted repeat*» (IR)-Konstrukt zu transformieren. Das IR-Konstrukt enthält invertierte Sequenzen desjenigen Abschnittes im Erbgut, der methyliert werden soll. Innerhalb der Pflanzenzellen wird das IR-Konstrukt erst zu einer *hairpin* RNA (hpRNA) transkribiert und dann in siRNA verwandelt. Die siRNA lenkt schliesslich die Methylierungsproteine an den vorbestimmten Abschnitt des Erbguts, so dass dort die Methylierung erfolgt (Lusser et al. 2011, Eamens et al. 2008). Da das neue Methylierungsmuster weitervererbt wird, ist in den Nachkommen der transformierten Pflanze das IR-Konstrukt nicht mehr notwendig, um die Methylierung auszulösen. Deshalb werden in einem letzten Züchtungsschritt diejenigen Nachkommen ausgelesen, die zwar das neue Methylierungsmuster besitzen, nicht aber das IR-Konstrukt (Lusser et al. 2011).



#### *3.4.1.2 Induktion der RdDM mittels transienter Transfektion*

Dieser Ansatz besteht darin, die genetische Vorlage für die dsRNA nur vorübergehend in Pflanzenzellen einzuführen. Da bei der transienten Transfektion keine stabile Insertion ins Erbgut beabsichtigt wird, können aus transfektierten Protoplasten Pflanzen regeneriert werden, die frei vom eingeführten genetischen Konstrukt sind (Lusser et al. 2011).

#### *3.4.1.3 Induktion der RdDM mittels VIGS*

Da siRNAs mobile Signale sind und sich innerhalb der Pflanze ausbreiten können (Molnar et al. 2010), besteht eine RdDM-Züchtungsstrategie darin, den Auslöser für die DNA-Methylierung mit Hilfe rekombinanter Pflanzenviren in die Pflanzenzellen einzuschleusen (Kanazawa et al. 2011a, Otagaki et al. 2011). Der Züchtungsansatz beruht dabei auf dem VIGS-Verfahren (siehe Abschnitt 3.2.1). Nachkommen VIGS-inokulierter Pflanzen können frei von rekombinanten Nukleinsäuren sein, wenn ein Virus eingesetzt wird, der nicht via Samen übertragen wird (Kanazawa et al. 2011a; siehe Abschnitt 3.2.1).

#### *3.4.1.4 Induktion der RdDM mittels Pfropfen*

Eine weitere Strategie des RdDM-Verfahrens besteht darin, die durch den Transfer von IR-Konstrukten vermittelte RdDM mit dem Pfropfen zu kombinieren (Bai et al. 2011). Wie im oben beschriebenen VIGS-System beruht auch hier die Züchtungsstrategie auf der Beobachtung, dass sich siRNAs innerhalb einer Pflanze ausbreiten können. Folgende beiden Systeme werden dabei ins Auge gefasst:

(1) Wird ein gentechnisch veränderter Reiser, der ein IR-Konstrukt enthält, auf einen nicht gentechnisch veränderten Wurzelstock gepfropft, so können die im Reiser produzierten siRNAs in den Wurzelstock transportiert werden und dort die gewollte Methylierung induzieren. Falls Schösslinge aus dem Wurzelstock wachsen, können diese zur Herstellung von epigenetisch modifizierten Pflanzen verwendet werden. Solche Pflanzen könnten zudem auch durch die Regeneration von Zellen des Wurzelstockes gewonnen werden (Bai et al. 2011).

(2) Das zweite System beinhaltet den umgekehrten Fall und somit die Möglichkeit, die Aktivität von Genen im gentechnisch nicht veränderten Reiser durch mobile siRNA aus dem gentechnisch veränderten Wurzelstock zu steuern (Bai et al. 2011). Das neue Methylierungsmuster kann dann an die Nachkommen des Reisers weitervererbt werden.

### **3.4.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht**

Durch das RdDM-Verfahren können in ausgewählten Sorten so genannte Epiallele erzeugt werden – das sind Allele, die zwar in ihrer DNA-Sequenz übereinstimmen, aber unterschiedlich exprimiert sind. Da die epigenetische Vielfalt die phänotypische Vielfalt und somit auch die Leistung von Pflanzen beeinflusst, ist RdDM für die Pflanzenzüchtung interessant. Das gilt insbesondere für Kulturpflanzenarten, die eine schmale genetische Basis haben.

Das Verfahren kann bei allen Kulturpflanzenarten eingesetzt werden, bei denen gentechnische Methoden etabliert sind, die das Einbringen von dsRNA in die Zellen ermöglichen (Lusser et al. 2011). Die Kombination des RdDM-Verfahrens mit dem Pfropfen könnte vor allem in der Züchtung neuer Frucht- oder Obstsorten von Interesse sein (Bai et al. 2011).

### **3.4.3 Stand der Entwicklung**

Die Strategie, mittels RdDM transgenfreie epigenetisch modifizierte Sorten zu züchten, ist bereits im Jahr 2001 formuliert worden (Wang & Waterhouse 2001). Dennoch finden sich in der Literatur erst wenige Veröffentlichungen dazu. Die Mehrheit der gefundenen Publikationen beschreibt das

TGS von Transgenen oder endogenen Pflanzengen mittels VIGS oder stabil ins Erbgut eingefügten IR-Konstrukten. Nur in einem Fall wird von einer induzierten Überexpression berichtet (Shibuya et al. 2009). Die Stilllegung von endogenen Pflanzengen ist bisher bei folgenden Kulturarten beschrieben worden: Petunien (Kanazwa et al. 2011a/b, Sijen et al. 2001), Mais (Cigan et al. 2005), Kartoffel (Heilersig et al. 2006), Reis (Okano et al. 2008), Karotte (Shibukawa et al. 2009) und Tomate (Kanazwa et al. 2011a). Obwohl die Stilllegung von endogenen Genen mittels RdDM in mehreren Fällen beschrieben worden ist, gibt es kaum veröffentlichte Beispiele, in denen das Silencing in Abwesenheit des Auslösers weitervererbt wurde (Kanazawa et al. 2011a, Nap & van Kessel 2011).

Die Strategie, das RdDM mit Pfropfen zu kombinieren, ist 2011 erstmals in der Literatur erwähnt worden (Bai et al. 2011).

Laut COGEM (2006a) steckt das RdDM-Verfahren noch in den Kinderschuhen. Schaart & Visser (2009) gehen davon aus, dass kurzfristig keine RdDM-Produkte zu erwarten sind. Eine im Jahr 2010 durchgeführte Umfrage bei Pflanzenzuchtunternehmen ergab, dass die Firmen RdDM gegenwärtig bei Mais (Forschungsphase) und Raps (Feldversuche) einsetzen (Lusser et al. 2011). Welche Eigenschaften dabei gezüchtet werden sollen, gaben die Firmen nicht bekannt (Lusser et al. 2011).

#### **3.4.4 Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen**

Das Ziel des RdDM-Verfahrens ist, Sorten mit neuen Epiallelen zu erzeugen. Die aus dem Verfahren hervorgehenden Sorten, die frei von extrazellulär eingeführten Sequenzen sind, weisen keine beabsichtigte genetische Veränderung auf. Die beabsichtigte Wirkung in diesen Sorten hängt davon ab, welche Sequenz im Erbgut gezielt methyliert wurde beziehungsweise bei welchem Gen das Expressionsniveau gesenkt oder erhöht ist.

#### **3.4.5 Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen**

In den aus dem RdDM-Verfahren hervorgehenden Sorten, die frei von extrazellulär eingeführten Sequenzen sind, könnten folgende unbeabsichtigten Veränderungen und Wirkungen auftreten:

Somaklonale Variationen: In den Fällen, in denen die RdDM via Transformation oder transiente Transfektion ausgelöst wird, beinhaltet der Prozess einen In-vitro-Schritt, weshalb Somaklonale Variationen auftreten können. Somaklonale Variationen umfassen sowohl genetische wie auch epigenetische Veränderungen im Erbgut (Miguel & Marum 2011), können bei allen aus In-vitro-Kulturen regenerierten Pflanzen auftreten (Bairu et al. 2011) und sind bei der Transformation vielfach beschrieben worden (z.B. Mori et al. 2007, Bubner et al. 2006, Goldman et al. 2004, Ellul et al. 2003, Heeres et al. 2002, Labra et al. 2001, Sala et al. 2000, Arencibia et al. 1999, Bregitzer et al. 1998, Veilleux & Johnson 1998). Zu den möglichen genetischen Veränderungen, die in aus In-vitro-Kulturen regenerierten Pflanzen beobachtet werden können, gehören Änderungen in der Chromosomenzahl und -struktur, Basensubstitutionen, Indels und die Aktivierung von transponierbaren Elementen (Neelakandan & Wang 2012, Jiang et al. 2011, Jain 2001). Das Ausmass der Veränderungen kann von einer Reihe von Faktoren abhängen wie beispielsweise dem Genotypen, dem In-vitro-System, der Genomgrösse, dem Alter der Kultur und den Wachstumshormonen im Nährmedium (Bairu et al. 2011).

Verlust der neuen Methylierung: Da nicht klar ist, über wie viele Generationen das neue Methylierungsmuster stabil weiter vererbt wird, kann eine unbeabsichtigte Wirkung darin bestehen, dass die Senkung beziehungsweise die Steigerung der Expression des Zielgens in der kommerzialisierten Sorte verloren geht (Lusser et al. 2011, COGEM 2006a).

Methylierung von Nicht-Zielsequenzen: Eine weitere mögliche unbeabsichtigte Wirkung kann daraus resultieren, dass Nicht-Zielsequenzen methyliert werden. Die Methylierung von Nicht-Zielsequenzen kann stattfinden, falls Nicht-Zielsequenzen Homologien zur Zielsequenz aufweisen oder falls aus der hpRNA unbeabsichtigt solche siRNAs entstehen, welche die Methylierungsproteine zu Nicht-Zielsequenzen lenkt (Lusser et al. 2011). Die Methylierung von Nicht-Zielsequenzen kann zur Änderung der Expression von Nicht-Zielgenen führen.

### **3.4.6 Sicherheitsaspekte**

Im Folgenden werden Aspekte aufgeführt, die bei der Bewertung der Sicherheit von Sorten, die aus dem RdDM-Verfahren hervorgehen, eine Rolle spielen könnten und zwar für den Fall, dass die Sorten nachweisbar frei von den während des Züchtungsprozesses extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen sind. Es wird kein Anspruch darauf erhoben, alle möglichen und denkbaren sicherheitsrelevanten Aspekte zu behandeln.

Senkung/Erhöhung der Expression des Zielgens: Ob die beabsichtigte Methylierung der Zielsequenz Sicherheitsfragen hervorruft oder nicht, hängt vom jeweiligen neu erzeugten Epiallel und dessen Expressionsniveau ab und ist somit von Fall zu Fall zu beurteilen.

Verlust des neuen Methylierungsmusters während des kommerziellen Anbaus: Inwieweit ein etwaiger Verlust des neuen Methylierungsmusters sicherheitsrelevant sein kann, hängt vom jeweiligen neu erzeugten Epiallel ab und ist somit von Fall zu Fall zu beurteilen.

Senkung/Erhöhung der Expression von Nicht-Zielgenen: Unbeabsichtigte Methylierungen können zur Senkung oder Erhöhung der Expression von Nicht-Zielgenen und somit zur Erzeugung neuer Epiallele führen. Änderungen des Expressionsniveaus von Nicht-Zielgenen können ineffektiv bleiben, unerwünschte Wirkungen verursachen oder erwünschte Auswirkungen haben. Inwieweit Pflanzen mit unbeabsichtigten Epiallelen während des Züchtungsprozesses aussortiert beziehungsweise weiterverwendet werden, hängt ab von der Manifestation der Expressionsänderungen ab sowie der Wahl der Selektionsmethoden. Unbeabsichtigte Methylierungen können auch spontan auftreten (Manning et al. 2006, Cubas et al. 1999), mit Gewebekulturtechniken verbunden sein (Rhee et al. 2010, Krizova et al. 2009) oder mittels Chemikalien ausgelöst werden (Fieldes et al. 2005). Neue unbeabsichtigte Epiallele treten deshalb bei anderen Züchtungsverfahren ebenfalls auf.

Somaklonale Variationen: Die im Falle der stabilen Transformation und transienten Transfektion auftretenden somaklonalen Variationen können ineffektiv bleiben, unerwünschte Wirkungen verursachen oder erwünschte Auswirkungen haben. Inwieweit Pflanzen mit somaklonalen Variationen während des Züchtungsprozesses aussortiert beziehungsweise weiterverwendet werden, hängt unter anderem ab von der Wahl der Primärtransformanten, der Manifestation der somaklonalen Variationen sowie der Wahl der Selektionsmethoden. Somaklonale Variationen können auch bei anderen Züchtungsverfahren auftreten, wie beispielsweise der In-vitro-Mutagenese. Beim Verfahren der somaklonalen Selektion werden sie zudem gezielt zur Herstellung neuer Sorten verwendet (Singh & Shetty 2011, Veilleux & Johnson 1998).

### **3.4.7 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden<sup>8</sup>**

*Erkennung:* Sorten aus dem RdDM-Verfahren weisen an vorbestimmten Stellen des Erbguts ein neues Methylierungsmuster auf. Die Erkennung solcher Muster könnte mit Methylierungs-spezifischen PCR-basierten Methoden möglich sein (Lusser et al. 2011).

*Identifikation:* Die Identifikation von Sorten, die aus dem RdDM-Verfahren hervorgehen und frei von extrazellulär eingeführten Sequenzen sind, ist gemäss Lusser et al. (2011) nicht möglich, selbst wenn Vorwissen zum Produkt vorhanden ist. Der Grund liegt darin, dass es sehr schwierig sei, zwischen natürlich vorkommender Methylierung und technisch induzierter Methylierung zu unterscheiden (Lusser et al. 2011).

### **3.4.8 Aspekte der GVO-Klassierung**

Im Folgenden werden Aspekte diskutiert, die bei GVO-Klassierung von Sorten aus dem RdDM-Verfahren eine Rolle spielen könnten, wenn die Sorten nachweisbar frei von den während des Züchtungsprozesses eingeführten Sequenzen sind. Die Diskussion erfolgt dabei separat für die vier Möglichkeiten, mit denen sich die RdDM auslösen lässt: Transformation, transiente Transfektion VIGS und Pflöpfen (siehe Abschnitt 3.4.1.1).

Eine Diskussion der GVO-Klassierung von Sorten aus dem RdDM-Verfahren im Lichte der EU-Richtlinie 2001/18/EG findet sich in NTWG (2011) und ZKBS (2012).

#### *3.4.8.1 Induktion der RdDM mittels Transformation*

Wird die RdDM mittels Transformation ausgelöst (Abschnitt 3.4.1.2), erfolgt am Schluss des Züchtungsprozesses eine Segregation der extrazellulär eingeführten genetischen Konstrukte. Die Null-Segregante (in Bezug auf die eingeführten Konstrukte) wirkt dabei als Ausgangsmaterial für die weitere Nutzung und Vermehrung. Damit stellt sich die Frage, ob Kreuzungsnachkommen einer stabil transformierten Pflanze als GVO gelten, wenn sie frei vom ursprünglich transformierten genetischem Material sind? Weder GTG noch FrSV geben hierzu eine konkrete Antwort. Ausserhalb der Gentechnikgesetzgebung finden sich hingegen Bestimmungen, die auf die gestellte Frage eingehen. Art. 9a Abs. 2 Vermehrungsmaterial-Verordnung hält dazu fest: Wird eine gentechnisch veränderte Sorte zur Züchtung verwendet, so gelten die davon abstammenden Sorten ebenfalls als gentechnisch verändert, ausser wenn nachgewiesen ist, dass sie die gentechnische Veränderung nicht mehr enthalten. In Art. 2 Bst. d der Verordnung des EDI über gentechnisch veränderte Lebensmittel (VGVL) steht hingegen, dass Organismen, die aus einer Kreuzung von GVO mit einem anderen Organismus hervorgehen, als GVO gelten. Ein Bezug auf das Vorhandensein der gentechnischen Veränderung wird hier nicht genommen.

Da weder GTG noch FrSV eine konkrete Antwort darauf geben, wie Null-Segreganten zu klassieren sind, lässt sich fragen, wie die Null-Segreganten im Lichte von Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV zu betrachten sein könnten. Eine Frage, die dabei zu klären sein könnte, ist, ob neu erzeugte Epiallele im Sinne der FrSV rechtlich betrachtet eine Veränderung des genetischen Materials sind oder nicht? Gemäss Wortlaut von Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV spielen bei der Legaldefinition von GVO nicht «genetische Veränderungen» eine Rolle, sondern «Veränderungen des genetischen Materials». Wissenschaftlich betrachtet sind Epiallele keine genetischen, sondern epigenetische Veränderungen; sie könnten aber als Veränderung des genetischen Materials angesehen werden. Inwieweit hier aus rechtlicher Sicht Klärungsbedarf besteht, bleibt zu prüfen.

---

<sup>8</sup> Mit Erkennung ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte festzustellen und zwar in Bezug auf eine geeignete Vergleichssorte. Mit Identifikation wiederum ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte als Veränderung zu erkennen, die absichtlich durch ein bestimmtes Verfahren eingeführt worden ist.

Zu prüfen sein könnte auch, ob das mögliche Auftreten von somaklonalen Variationen einen Einfluss auf die GVO-Klassierung hat oder nicht. Bei stabil transformierten Pflanzen kann es während des Herstellungsprozesses zu somaklonalen Variation und damit zu unbeabsichtigten genetischen Veränderungen kommen. Diese Veränderungen können unabhängig von den gentechnisch inserierten Sequenzen weitervererbt werden und deshalb in den RdDM-Sorten noch vorhanden sein, nachdem die gentechnisch inserierten Sequenzen ausgekreuzt worden sind. Die aus stabil transformierten gentechnisch veränderten Pflanzen hervorgehenden RdDM-Sorten können somit genetische Veränderungen aufweisen, die durch das gentechnische Verfahren ausgelöst worden sind. Ob diese Sorten deshalb als GVO zu klassieren sind, ist zu klären. Zu beachten sein könnte bei dieser Klärung auch Anhang 1 Abs. 3 Bst. a FrSV. Dort wird festgehalten, dass die Mutagenese kein gentechnisches Verfahren ist. Da somaklonale Variationen auch bei gewissen Anwendungen der Mutagenese auftreten können, gilt somit implizit, dass somaklonale Variationen an und für sich nicht als gentechnische Veränderung gemäss FrSV gelten. Anhang 1 Abs. 3 FrSV hält nun jedoch des Weiteren fest, dass die Mutagenese dann ein gentechnisches Verfahren ist, wenn sie mit dem Einsatz von GVO oder rekombinanten Nukleinsäuren verbunden ist. Wird hier die somaklonale Variation wiederum implizit mitgedacht, so stellt sich die Frage, ob RdDM-Sorten, die somaklonale Variationen aufweisen, als GVO zu klassieren sind, weil das RdDM-Verfahren mit dem Einsatz von GVO und rekombinanten Nukleinsäuren verbunden ist.

Je nachdem wie die Antworten auf die oben aufgeworfenen Fragen beantwortet werden, sind folgende Sichtweisen auf die GVO-Klassierung möglich: Aus einer Prozess-bezogenen Sichtweise liesse sich argumentieren, dass die entstehenden Sorten als GVO zu klassieren sind, weil sie Veränderungen am genetischen Material (neue Epialle und/oder somaklonale Variationen) aufweisen, die auf eine gentechnische und somit natürlicherweise nicht vorkommende Methode zurückgehen. Aus einer Produkt-bezogenen Perspektive wiederum liesse sich argumentieren, dass die Sorten nicht als GVO zu klassieren sind, weil sie Veränderungen am genetischen Material aufweisen, die auch natürlicherweise oder bei nicht gentechnischen Züchtungsverfahren erzeugt werden können.

#### *3.4.8.2 Induktion der RdDM mittels transienter Transfektion*

Wird die RdDM mittels transienter Transfektion ausgelöst (Abschnitt 3.4.1.2), so entsteht aus einer aus Protoplasten oder Zellen regenerierten Pflanze die gewünschte Sorte. Da es bei der transienten Transfektion nicht zu einer stabilen Insertion der eingeführten Sequenzen kommt, resultiert die Sorte somit aus einem Erbgut, in welches nie extrazellulär eingeführte Sequenzen inseriert worden sind. Falls eine aus transfektierten Protoplasten oder Zellen regenerierte Pflanze als GVO gälte, würde sich wie unter 3.4.8.1 die Frage stellen, wie deren Nachkommen zu klassieren sind. Hinsichtlich Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV könnten bei der GVO-Klassierung der Nachkommen die in Abschnitt 3.4.8.1 aufgeworfene Frage zu klären sein, ob neue Epiallele im Sinne der FrSV eine Veränderung am genetischen Material sind oder nicht.

#### *3.4.8.3 Induktion der RdDM mittels VIGS*

Wird die RdDM mittels VIGS ausgelöst (Abschnitt 3.4.1.3), so entsteht aus den Nachkommen einer Pflanze, die einen GVO enthält, die gewünschte Sorte. Anders als bei der Induktion mittels Transformation resultiert die Sorte somit aus einem Erbgut, in welches nie extrazellulär eingeführte Sequenzen inseriert worden sind. Falls Pflanzen, die einen rekombinanten Virus enthalten, selbst als GVO zu klassieren sind, würde sich wie unter 3.4.8.1 die Frage stellen, wie Kreuzungsnachkommen zu klassieren sind. Falls VIGS-behandelte Pflanzen selbst nicht als GVO gelten, kann

argumentiert werden, dass deren Nachkommen ein Kreuzungsprodukt aus nicht gentechnisch veränderten Pflanzen sind und somit nicht als GVO zu klassieren sein könnten.

Ob Nachkommen von Pflanzen, die rekombinante Viren enthielten, als GVO zu klassieren sind oder nicht, wenn sie frei vom rekombinanten Virus sind, wird in der FrSV nicht konkret beantwortet. Hinsichtlich Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV könnten bei der GVO-Klassierung der Nachkommen die in Abschnitt 3.4.8.1 aufgeworfene Frage zu klären sein, ob neue Epiallele im Sinne der FrSV eine Veränderung am genetischen Material sind oder nicht.

#### *3.4.8.4 Induktion der RdDM mittels Pfropfen*

Wird die RdDM mittels Pfropfen ausgelöst (Abschnitt 3.4.1.4), so entsteht aus den Nachkommen eines gentechnisch nicht veränderten Reisers die gewünschte Sorte. Wie bei der Auslösung der RdDM mittels transienter Transfektion und VIGS resultiert die Sorte somit aus einem Erbgut, in welches nie extrazellulär eingeführte Sequenzen inseriert worden sind.

Falls eine Pfropfchimäre rechtlich als eine Pflanze gälte, wäre der Reiser ein GVO, weshalb sich wie unter 3.6.8.1 die Frage stellen würde, wie Kreuzungsnachkommen zu klassieren sind. Gälte die Chimäre hingegen als zwei Pflanzen, wäre der Reiser kein GVO, weshalb auch seine Nachkommen nicht als GVO zu klassieren sein könnte.

Ob Nachkommen eines Reisers, der auf einen stabil transformierten Wurzelstock gepfropft ist, als GVO zu klassieren sind oder nicht, wird in der FrSV nicht konkret beantwortet (vgl. Abschnitt 3.9.8). Hinsichtlich Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV könnten bei der GVO-Klassierung der Nachkommen wiederum die in Abschnitt 3.4.8.1 aufgeworfene Frage zu klären sein, ob neue Epiallele im Sinne der FrSV eine Veränderung am genetischen Material sind oder nicht.

### **3.5 Reverse Breeding (RB)**

*Reverse breeding* (RB) ist ein Züchtungsverfahren, das gentechnische Methoden nutzt, um die meiotische Rekombination zu unterdrücken, und so die Züchtung von F<sub>1</sub>-Hybriden erleichtert (Dirks et al. 2009, 2003). Da die gentechnische Veränderung im Endprodukt nicht mehr gebraucht wird, können aus dem *Reverse Breeding* F<sub>1</sub>-Hybride hervorgehen, die frei von extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen sind (Lusser et al. 2012, 2011, Chan 2010, Dirks et al. 2009, Wijnker & de Jong 2008).

Das *Reverse Breeding* kann dem *transgenic construct driven breeding* zugerechnet werden (Lusser & Rodriguez-Cerezo 2012).

#### **3.5.1 Beschreibung der Technik**

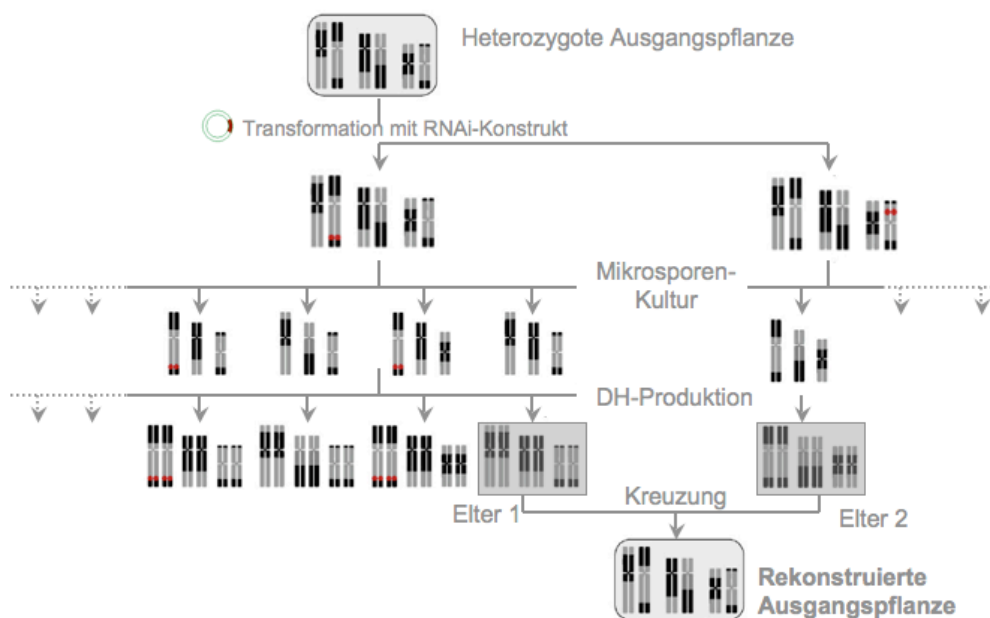
Das Verfahren des *Reverse Breeding* besteht aus einer Kombination aus gentechnischen Methoden, Techniken zur Herstellung doppelhaploider Pflanzen (DH-Technik), Gewebekulturtechniken und herkömmlichen Kreuzungsverfahren.

Die gentechnischen Methoden werden dazu benutzt, um bei einer ausgewählten heterozygoten Sorte die meiotische Rekombination zu unterdrücken. Erreicht werden kann dies, indem die Expression von solchen pflanzeigenen Genen stillgelegt wird, die am meiotischen Rekombinationsprozess beteiligt sind (Schaart & Visser 2009, COGEM 2006a). Für die Stilllegung dieser Gene stehen drei gentechnische Strategien zur Diskussion: Transformation, VIGS und Pfropfen (Dirks et al. 2009). Welche der drei Strategien gegenwärtig auch erprobt werden, kann anhand der gesichteten Materialien nicht beantwortet werden.

### 3.5.1.1 Unterdrückung der meiotischen Rekombination mittels Transformation

Diese Strategie beruht darauf, so genannte RNAi-Konstrukte stabil ins Erbgut der Pflanze einzufügen. Die RNAi-Konstrukte enthalten Sequenzen, die homolog zu Sequenzen des stillzulegenden Gens sind, und lösen innerhalb der Pflanzenzellen den Prozess des posttranskriptionellen Gen-Silencings (PTGS) aus. Die wichtigsten Züchtungsschritte sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt und im Folgenden beschrieben (Lusser et al. 2011, Schaart & Visser 2009):

1. Auswahl der heterozygoten Pflanze, die reproduziert werden soll;
2. Transformation der ausgewählten Pflanze mit RNAi-Konstrukt; dabei werden mehrere Primärtransformanten hergestellt, die das RNAi-Konstrukt in unterschiedlichen Chromosomen inseriert haben.
3. Herstellung von haploiden Mikrosporen (unreife Pollenkörner) von den Blüten der gentechnisch veränderten Pflanzen;
4. Herstellung homozygoter Zellen durch die Verdoppelung des Erbguts der haploiden Mikrosporen (durch den Einsatz der DH-Technik);
5. Herstellung homozygoter diploider Pflanzen aus den Mikrosporen (durch Gewebekulturtechnik);
6. Selektion derjenigen homozygot diploiden Pflanzen, die das RNAi-Konstrukte nicht enthalten;
7. Kreuzen derjenigen transgenfreien Pflanzen, die zusammen die ursprüngliche heterozygote Pflanze rekonstruieren.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des *Reverse Breeding* nach Wjinker & de Jong (2008). Die fiktive Ausgangspflanze ist ein F1-Hybrid mit drei Chromosomenpaaren ( $2n=2x=6$ ). Die meiotische Rekombination wird unterdrückt, indem der F1-Hybrid mit einem RNAi-Konstrukt transformiert wird. Das RNAi-Konstrukt führt zur Stilllegung eines der Gene, das für das Crossing-over benötigt wird. Die roten Punkte repräsentieren die eingeführten RNAi-Konstrukte. Die achiasmatische Meiose führt zu Sporen, die nicht rekombinante Chromosomen besitzen. Die meisten der entstehenden Sporen sind unausgeglichen (nicht gezeigt), einige der Sporen sind ausgeglichen (mehrere Möglichkeiten sind dargestellt). Aus den ausgeglichenen Sporen werden doppelhaploide Pflanzen produziert. Unter den doppelhaploiden Pflanzen können diejenigen reziproken Genotypen (Elter 1 und Elter 2) ausgesucht werden, die das RNAi-Konstrukt nicht mehr besitzen und nach Kreuzung den ursprünglichen F1-Hybrid ergeben. Elter 1 und Elter 2 stammen von zwei unterschiedlichen Primärtransformanten ab, die das RNAi-Konstrukt in verschiedenen Chromosomen aufweisen. Bildquelle: Wjinker & de Jong (2008).

### 3.5.1.2 Unterdrückung der meiotischen Rekombination mittels VIGS

Da RNAs mobile Signale sein können und sich innerhalb der Pflanze ausbreiten können (Molnar et al. 2010), könnte eine Züchtungsstrategie darin bestehen, die meiotische Rekombination mit Hilfe rekombinanter Pflanzenviren, die ein entsprechendes RNAi-Konstrukt besitzen, zu unterdrücken. Der Ansatz beruht dabei auf dem VIGS-Verfahren (Abschnitt 3.2). Nachkommen VIGS-behandelter Pflanzen können frei von rekombinanten Nukleinsäuren sein, wenn ein Virus eingesetzt wird, der nicht via Samen übertragen wird (Kanazawa et al. 2011a; siehe Abschnitt 3.2.1).

### 3.5.1.3 Unterdrückung der meiotischen Rekombination mittels Pfropfen

Da RNAi-Signale vom Wurzelstock in einen aufgepfropften Reiser transportiert werden können (siehe Abschnitt 3.10.5.2), besteht eine weitere Strategie des *Reverse Breeding* darin, Reiser auf einen Wurzelstock zu pflanzen, der mit RNAi-Konstrukten transformiert worden ist. Durch den Transport der RNAi-Signale kann in den Reisern die meiotische Rekombination unterdrückt werden. Da die RNAi-Konstrukte nicht vom Wurzelstock in die generativen Teile des Reisers transportiert werden dürften (Abschnitt 3.9.5), sind die Kreuzungsnachkommen frei von extrazellulär eingeführten Sequenzen.

## 3.5.2 Anwendung in der Pflanzenzucht

In der Literatur werden vor allem zwei mögliche Anwendungen des *Reverse Breeding* diskutiert: Herstellung von  $F_1$ -Hybriden für die Landwirtschaft und Erzeugung von Chromosomen-Substitutionslinien für die weitere Züchtung (Lusser et al. 2011, Chan 2010, Dirks et al. 2009, Wijnker & de Jong 2008, Forster et al. 2007). Diese Anwendungen sind bei Pflanzenarten möglich, die nicht mehr als 12 Chromosomen haben und bei denen die DH-Technik angewendet werden kann (Lusser et al. 2011, Dirks et al. 2009).

Die wichtigste Anwendung des RB-Verfahrens besteht in der Erhaltung von Elite-Genotypen beziehungsweise der Herstellung von  $F_1$ -Hybriden. Da sich mit dem *Reverse Breeding* für jede beliebige heterozygote Pflanze die homozygoten Eltern erzeugen lassen, wird es möglich, auch uncharakterisierte heterozygote Genotypen mit Eliteeigenschaften zu erhalten. Mit herkömmlichen Züchtungsmethoden ist dies kaum zu erreichen (Dirks et al. 2009, Wijnker & de Jong 2008). Das *Reverse Breeding* erleichtert und beschleunigt die Züchtung von  $F_1$ -Hybriden (Schaart & Visser 2009).

Neben der Herstellung von  $F_1$ -Hybriden kann das *Reverse Breeding* auch dazu benutzt werden, Chromosomen-Substitutionslinien zu erzeugen. Diese Linien enthalten ein oder mehrere Chromosomen eines Elternteils im genetischen Hintergrund des anderen Elternteils. Durch Rückkreuzung könne so beispielsweise Hybride entstehen, die für alle ausser einem Chromosom heterozygot sind beziehungsweise die für alle ausser einem Chromosomen homozygot sind (Dirks et al. 2009). Chromosomen-Substitutionslinien können für die Zuordnung von Eigenschaften sowie die Verbesserung der Elternlinien genutzt werden (Lusser et al. 2011, Chan 2010, Wijnker & de Jong 2008).

In Zukunft könnte es des Weiteren möglich werden, das *Reverse Breeding* mit dem Verfahren der Zentromer-vermittelten Genomelimination zu kombinieren (Chan 2010; siehe Abschnitt 3.11.3).

## 3.5.3 Stand der Entwicklung

Das *Reverse Breeding* wurde 2003 erstmals beschrieben (Dirks et al. 2003). Die Machbarkeit an der Modellpflanze Arabidopsis ist 2012 veröffentlicht worden (Wijnker et al. 2012). In der Literatur werden die Strategie und mögliche Anwendungen des RB-Verfahrens diskutiert (Chan 2010, Dirks



et al. 2009, Wijnker & de Jong 2008, Forster et al. 2007), konkrete Anwendungsbeispiele an Kulturpflanzen finden sich gegenwärtig jedoch nicht.

Gemäss Schaart & Visser (2009) und COGEM (2006a) steckt das *Reverse Breeding* noch in der Forschungsphase. Dem entspricht auch das Resultat einer im Jahr 2010 im Auftrag der EU-Kommission durchgeführten Umfrage, in der Pflanzenzuchtfirmen angaben, das *Reverse Breeding* erst im Forschungsstadium anzuwenden (Lusser et al. 2011).

### **3.5.4 Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen**

Das beabsichtigte Ziel des *Reverse Breeding* ist, aus heterozygoten Pflanzen komplementierende homozygote Elternlinien herzustellen und dabei nicht-rekombinante Chromosomen in doppelhaploiden Linien zu fixieren. Aus dem Verfahren hervorgehende homozygote Elternlinien, die frei von extrazellulär eingeführten Sequenzen sind, besitzen keine beabsichtigten Veränderungen in der DNA-Sequenz. Die aus der Kreuzung der homozygoten Elternlinien resultierenden F<sub>1</sub>-Hybride weisen im Vergleich zur Ausgangspflanze keine beabsichtigten genetischen Veränderungen auf.

Aus dem *Reverse Breeding* hervorgehende homozygote Elternlinien, die frei von extrazellulär eingeführten Sequenzen sind, weisen im Vergleich zur heterozygoten Ausgangslinie keine neuen, beabsichtigten Wirkungen auf. Die aus der Kreuzung der homozygoten Elternlinien resultierenden F<sub>1</sub>-Hybride sind hinsichtlich der beabsichtigten Wirkungen identisch mit der Ausgangslinie.

### **3.5.5 Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen**

In den aus dem *Reverse Breeding* hervorgehenden homozygoten Elternlinien und F<sub>1</sub>-Hybriden, die frei von extrazellulär eingeführten Sequenzen sind, könnten folgende unbeabsichtigten Veränderungen und Wirkungen auftreten:

Somaklonale Variationen: Wird die meiotische Rekombination mittels Transformation unterdrückt (Abschnitt 3.5.1.1), so erfolgt ein In-vitro-Schritt, weshalb somaklonale Variationen auftreten können. Somaklonale Variationen umfassen sowohl genetische wie auch epigenetische Veränderungen im Erbgut (Miguel & Marum 2011), können bei allen aus In-vitro-Kulturen regenerierten Pflanzen auftreten (Bairu et al. 2011) und sind bei der Transformation vielfach beschrieben worden (z.B. Mori et al. 2007, Bubner et al. 2006, Goldman et al. 2004, Ellul et al. 2003, Heeres et al. 2002, Labra et al. 2001, Sala et al. 2000, Arencibia et al. 1999, Bregitzer et al. 1998, Veilleux & Johnson 1998). Zu den möglichen genetischen Veränderungen, die in aus In-vitro-Kulturen regenerierten Pflanzen beobachtet werden können, gehören Änderungen in der Chromosomenzahl und -struktur, Basensubstitutionen, Indels und die Aktivierung von transponierbaren Elementen (z.B. Neelakandan & Wang 2012, Jiang et al. 2011, Jain 2001). Das Ausmass der Veränderungen kann von einer Reihe von Faktoren abhängen wie beispielsweise dem Genotypen, dem In-vitro-System, der Genomgrösse, dem Alter der Kultur und den Wachstumshormonen im Nährmedium (Bairu et al. 2011).

Gametoklonale Variationen: Werden aus kultivierten gametischen Geweben wie zum Beispiel Mikrosporenkulturen haploide Pflanzen regeneriert, so können in diesen gametoklonale Variationen auftreten (Sarkar et al. 2010, Forster et al. 2007, Huang 1996, Evans et al. 1984). Gametoklonale Variationen umfassen sowohl genetische wie auch epigenetische Veränderungen im Erbgut (Sarkar et al. 2010).

Methylierung von Nicht-Zielgenen: Das während des Züchtungsprozesses eingeführte RNAi-Konstrukt könnte nicht nur das Zielgen, sondern auch weitere homologe Sequenzen im Erbgut der Pflanze stilllegen (Lusser et al. 2011). Da die RNA-Interferenz gelegentlich via RNA-dirigierte DNA-Methylierung zu einem transkriptionellen Gen-Silencing führen kann, könnte ein neu entstandenes

Methylierungsmuster und somit auch der damit möglicherweise verbundene Phänotyp auf die Folgegenerationen stabil weiter vererbt werden (Schaart & Visser 2009). Eine unbeabsichtigte Methylierung kann zur Änderung der Expression von Nicht-Zielgenen führen.

Unvollständige Repression der meiotischen Rekombination: Es ist möglich, dass die Meiose nicht vollständig unterdrückt wird (Lusser et al. 2011). Eine unvollständige Unterdrückung würde dazu führen, dass Meiose und Rekombination unbeabsichtigt zu einem gewissen Masse stattfinden. Meiose und Rekombination sind in Pflanzen natürliche Prozesse.

### **3.5.6 Sicherheitsaspekte**

Im Folgenden werden Aspekte aufgeführt, die bei der Bewertung der Sicherheit von Sorten aus dem RB-Verfahren eine Rolle spielen könnten und zwar für den Fall, dass die Sorten nachweisbar frei von den während des Züchtungsprozesses extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen sind. Es wird kein Anspruch darauf erhoben, alle möglichen und denkbaren sicherheitsrelevanten Aspekte zu behandeln.

Somaklonale Variationen: Somaklonale Variationen sind in den Fällen zu berücksichtigen, in denen die meiotische Rekombination mittels Transformation unterdrückt wird (Abschnitt 3.5.1.1). Somaklonale Variationen können ineffektiv bleiben und erwünschte Auswirkungen haben. Sie können auch unerwünschte Wirkungen verursachen und deshalb sicherheitsrelevant sein. Somaklonale Variationen können auch bei anderen Züchtungsverfahren auftreten, wie beispielsweise der In-vitro-Mutagenese. Zudem werden sie beim Zuchtverfahren der somaklonalen Selektion gezielt zur Herstellung neuer Sorten verwendet (Singh & Shetty 2011, Veilleux & Johnson 1998).

Gametoklonale Variationen: Gametoklonale Variationen können ineffektiv bleiben, unerwünschte Wirkungen verursachen oder erwünschte Auswirkungen haben. Sie treten auch bei der Haploidenzüchtung auf und zwar in den Fällen, in denen haploide Pflanzen aus Antheren- oder Mikrosporenkulturen erzeugt werden (Germana 2011b).

Senkung/Erhöhung der Expression von Nicht-Zielgenen: Unbeabsichtigte Methylierungen können zur Senkung oder Erhöhung der Expression von Nicht-Zielgenen und somit zur Erzeugung neuer Epiallele führen. Änderungen des Expressionsniveaus von Nicht-Zielgenen können ineffektiv bleiben, unerwünschte Wirkungen verursachen oder erwünschte Auswirkungen haben. Unbeabsichtigte Methylierungen können auch spontan auftreten (Manning et al. 2006, Cubas et al. 1999), mit Gewebekulturtechniken verbunden sein (Miguel & Marum 2011, Rhee et al. 2010, Krizova et al. 2009) oder mittels Chemikalien ausgelöst werden (Fieldes et al. 2005). Neue unbeabsichtigte Epiallele treten deshalb auch bei herkömmlichen Züchtungsverfahren auf.

### **3.5.7 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden<sup>9</sup>**

Erkennung: Die beabsichtigten Endprodukte des RB-Verfahrens sind homozygote Elternlinien beziehungsweise F<sub>1</sub>-Hybride, die frei von extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen sind. Da diese Produkte keine beabsichtigten genetischen Veränderungen aufweisen, können sie nicht erkannt werden.

Identifikation: Die beabsichtigten Endprodukte des RB-Verfahrens sind homozygote Elternlinien beziehungsweise F<sub>1</sub>-Hybride, die frei von extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen sind. Da diese Produkte nicht von Sorten unterschieden werden können, die aus der herkömmlichen Hybrid-

---

<sup>9</sup> Mit Erkennung ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte festzustellen und zwar in Bezug auf eine geeignete Vergleichssorte. Mit Identifikation wiederum ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte als Veränderung zu erkennen, die absichtlich durch ein bestimmtes Verfahren eingeführt worden ist.

züchtung stammen, können sie nicht als Produkte des RB-Verfahrens identifiziert werden (Lusser et al. 2011, COGEM 2006a).

### **3.5.8 Aspekte der GVO-Klassierung**

Im Folgenden werden Aspekte diskutiert, die bei GVO-Klassierung von Sorten aus dem RB-Verfahren eine Rolle spielen könnten und zwar für den Fall, dass für die Unterdrückung der meiotischen Rekombination mittels Transformation erfolgte (3.5.1.1) und die Sorten nachweisbar frei von den während des Züchtungsprozesses extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen sind. Nicht behandelt werden im Folgenden solche Aspekte, die eine Rolle spielen könnten, wenn die meiotische Rekombination via VIGS (3.5.1.2) oder Pfropfen (3.5.1.3) unterdrückt wird.

Eine Diskussion der GVO-Klassierung von Sorten des *Reverse Breeding* im Lichte der EU-Richtlinie 2001/18/EG findet sich in NTWG (2011) und ZKBS (2012).

Wird die meiotische Rekombination mittels Transformation unterdrückt, sind die aus dem RB-Verfahren resultierenden Sorten Kreuzungsnachkommen von Pflanzen, die aus transgenfreien Mikrosporen der gentechnisch veränderten Ausgangspflanze regeneriert worden sind. Wie solche Sorten rechtlich zu klassieren sind, wird weder im GTG noch in der FrSV konkret beantwortet.

Im Hinblick auf Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV lassen sich die resultierenden Sorten sowohl aus einer Prozess-bezogenen wie auch Produkt-bezogenen Sichtweise betrachten. Der Sachverhalt ist dabei vergleichbar mit der Situation, die bei der GVO-Klassierung von Null-Segreganten besteht (vgl. Abschnitte 3.4.8.1 und 3.6.8.1).

Aus einer Prozess-bezogenen Sichtweise lässt sich dabei argumentieren, dass der Züchtungsprozess ein gentechnisches Verfahren gemäss FrSV beinhaltet, weshalb die Sorten als GVO zu klassieren seien. Gegen diese Sichtweise lässt sich einwenden, dass die Sorten im Vergleich zur Ausgangspflanze keine beabsichtigten Veränderungen an ihrem genetischen Material aufweisen, weshalb der Tatbestand von Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV nicht erfüllt sei. Dagegen wiederum liesse sich anführen, dass die Sorten somaklonale Variationen und damit unbeabsichtigte genetische Veränderungen aufweisen können (3.5.4.2), die auf das gentechnische Verfahren zurückgehen.

Aus einer Prozess-bezogenen Sichtweise lässt sich argumentieren, dass die resultierenden Sorten nicht als GVO zu klassieren seien, weil sie auch durch herkömmliche Züchtungsverfahren wie die Hybridzüchtung erzeugt werden können und keine Änderungen an ihrem genetischen Material aufweisen, die nicht auch natürlicherweise oder bei der Mutagenese entstehen könnten.

Somaklonale Variationen werden weder im GTG noch in der FrSV explizit behandelt. Implizit kommen sie jedoch in Anhang 1 Abs. 3 Bst. a FrSV vor. Dort wird festgehalten, dass die Mutagenese kein gentechnisches Verfahren ist. Da somaklonale Variationen auch bei gewissen Anwendungen der Mutagenese auftreten können, gilt somit implizit, dass die Erzeugung somaklonaler Variationen an und für sich nicht als gentechnische Veränderung gemäss FrSV gilt. Anhang 1 Abs. 3 FrSV hält nun jedoch des Weiteren fest, dass die Mutagenese dann ein gentechnisches Verfahren ist, wenn sie mit dem Einsatz von GVO oder rekombinanten Nukleinsäuren verbunden ist. Wird hier die somaklonale Variation wiederum implizit mit gedacht, so stellt sich die Frage, ob die Sorten aus dem RB-Verfahren, die somaklonale Variationen aufweisen, als GVO zu klassieren sind, weil das Verfahren mit dem Einsatz von GVO verbunden ist. Gemäss erläuternden Bericht zur FrSV (EDI 1997) kann der Ausdruck «mit dem Einsatz von GVO» so verstanden werden, dass die eingesetzten Organismen bereits bei Beginn des Verfahrens gentechnisch verändert sind.

Da beim RB-Verfahren auch unbeabsichtigter Methylierungen und somit neue Epialle auftreten könnten, stellt sich wie bei den somaklonalen Variationen die Frage, ob sie einen Einfluss auf die GVO-Klassierung haben könnten. Gemäss Wortlaut von Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV spielen bei der

Legaldefinition von GVO nicht «genetische Veränderungen» eine Rolle, sondern «Veränderungen des genetischen Materials». Wissenschaftlich betrachtet sind Epiallele keine genetischen, sondern epigenetische Veränderungen; sie könnten aber als Veränderung des genetischen Materials angesehen werden (siehe dazu auch Abschnitt 3.4.8).

### **3.6 Beschleunigte Züchtung**

Die Beschleunigte Züchtung ist ein Verfahren, das gentechnische Methoden dazu nutzt, den Züchtungsprozess zu beschleunigen, indem eine Blühverfrühung (*early flowering*) induziert wird (Schaart & Visser 2009). Da die gentechnische Veränderung im Endprodukt nicht mehr gebraucht wird, können Sorten entstehen, die frei von extrazellulär eingeführten Sequenzen sind (Le Roux et al. 2012, Schaart & Visser 2009).

Das Verfahren wird auch als FastTrack-Züchtungssystem (Waltz 2012) oder High-Speed-Züchtungstechnik (Flachowsky et al. 2011) bezeichnet.

#### **3.6.1 Beschreibung der Technik**

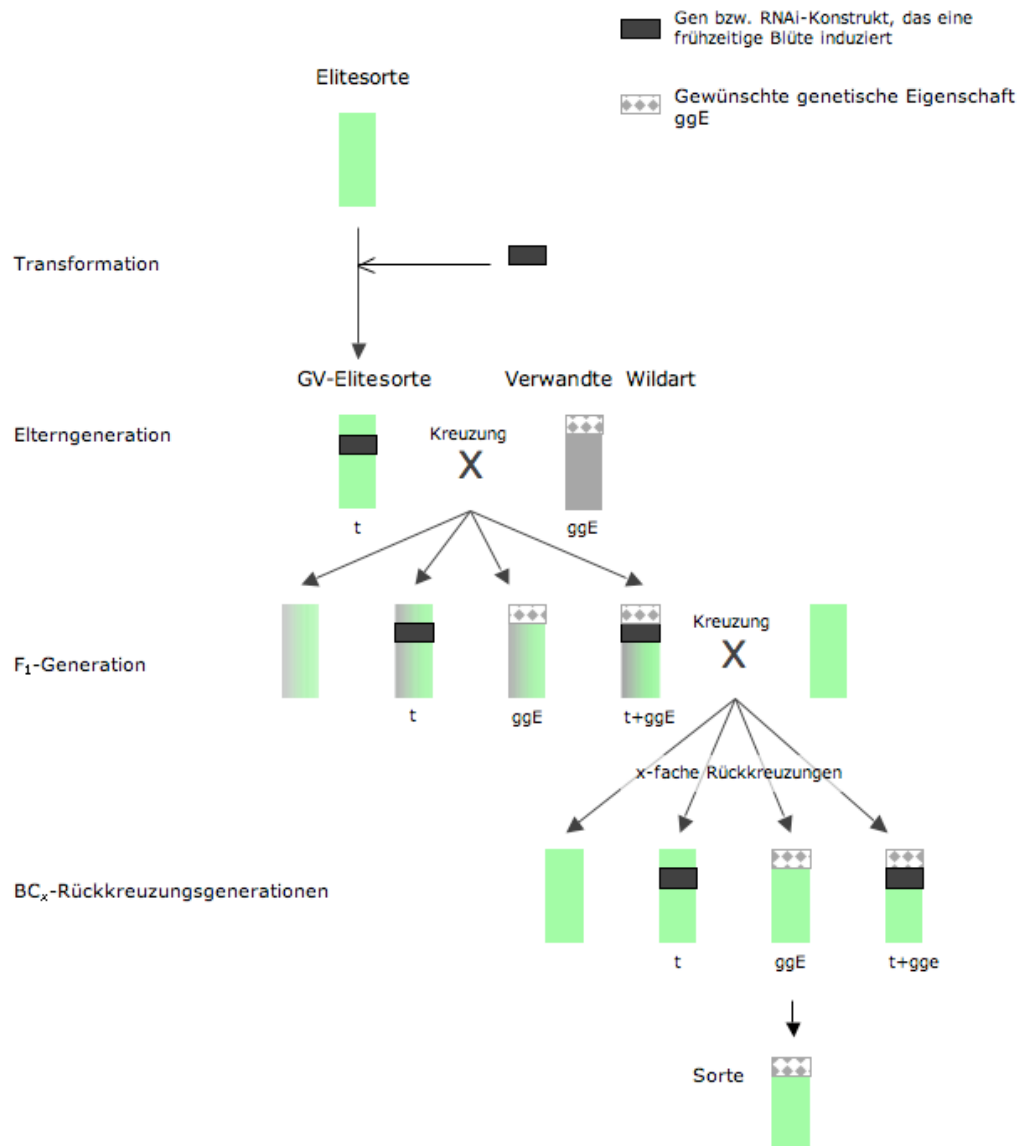
Das Verfahren der Beschleunigten Züchtung kombiniert gentechnische Methoden mit der herkömmlichen Methode des Kreuzens zweier verschiedener Elterpflanzen. Die gentechnischen Methoden werden dabei dazu genutzt, in einer ausgewählten Sorte eine frühzeitige Blüte zu induzieren. Die früh blühende Sorte wird dann mit einer anderen Sorte gekreuzt.

Die bei der Beschleunigten Züchtung einkreuzbaren Gene können zumindest theoretisch sowohl aus dem primären und sekundären als auch tertiären Genpool einer Sorte stammen. So können nicht nur bestehende Sorten, Landsorten oder sexuell kompatible Wildarten als Genquelle wirken, sondern auch nicht sexuell kompatible Arten. Letzteres ist auf zwei Wegen möglich: Erstens indem vor dem Start der Beschleunigten Züchtung die gewünschten Gene aus einer nicht kreuzbaren Art via Brückenkreuzung in eine sexuell kompatible Art eingekreuzt werden. Zweitens indem vor dem Start der Beschleunigten Züchtung Gene aus dem tertiären Genpool via *embryo rescue*-Verfahren in den primären Genpool transferiert werden.

Die Induktion der Blühverfrühung kann entweder durch die Expression von gentechnisch eingefügten «Blüteninduktionsgenen» (z.B. BpMADS4) oder durch die Stilllegung endogener Gene (z.B. TFL1) mittels der RNAi-Technik (Schaart & Visser 2009) erfolgen. Um die Expression beziehungsweise Stilllegung dieser Gene zu erreichen, werden gegenwärtig vier verschiedene gentechnische Strategien erprobt oder diskutiert: Transformation (z.B. Le Roux et al. 2012, Flachowsky et al. 2011), VIGS (Sasaki et al. 2011), VUGE (Yamagishi et al. 2011, Yamagishi & Yoshikawa 2011a/b) und Pflöpfen (Febres et al. 2011, Zhang et al. 2010a).

##### *3.6.1.1 Induktion der Blühverfrühung mittels Transformation*

Diese Strategie beruht darauf, das Erbgut einer ausgewählten Sorte entweder mit Expressionskassetten oder mit RNAi-Konstrukten stabil zu transformieren. RNAi-Konstrukte werden eingesetzt, falls zur Blühverfrühung endogene Gene stillgelegt werden sollen. In den anderen Fällen kommen Expressionskassetten zum Einsatz. Ist eine frühzeitig blühende gentechnisch veränderte Pflanze erzeugt, wird sie in einem herkömmlichen Züchtungsprogramm als Elter eingesetzt. Im letzten Schritt des Verfahrens werden die eingeführten Konstrukte ausgekreuzt; das heißt, es werden diejenigen Kreuzungsnachkommen ausgewählt, welche zwar die eingekreuzte Eigenschaft besitzen, nicht aber die Expressionskassetten beziehungsweise die RNAi-Konstrukte (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Vereinfachtes Züchtungsschema für den Fall, dass eine Blühverfrüherung mittels stabiler Transformation induziert wird, um eine gewünschte genetische Eigenschaft aus einer Wildart in eine Elitesorte einzukreuzen (nach Flachowsky et al. 2009). Das Züchtungsschema besteht im Wesentlichen aus folgenden Schritten: (1) Die Pflanzensorte, in welche die gewünschten genetischen Eigenschaften eingekreuzt werden sollen, werden gentechnisch so verändert, dass sie früher als natürlicherweise zur Blüte kommen. (2) Die gentechnisch veränderte Pflanzensorte wird mit der Sorte gekreuzt, welche die gewünschten genetischen Eigenschaften enthält. (3) Die Nachkommen der Kreuzung (Filialgeneration 1, F<sub>1</sub>) werden selektiert, wobei diejenigen Individuen zur Weiterzucht ausgelesen werden, die sowohl die gentechnisch eingefügten Gene für das frühzeitige Blühen als auch die gewünschten genetischen Eigenschaften enthalten. (4) Die selektierten F<sub>1</sub>-Pflanzen werden mit der gentechnisch nicht-veränderten Elternpflanze gekreuzt, in welche die gewünschten genetischen Eigenschaften eingekreuzt werden soll. (5) Die Nachkommen der Pseudo-Rückkreuzung<sup>10</sup> (*backcross generation*, BC<sub>1</sub>) werden selektiert, wobei wiederum diejenigen zur Weiterzucht ausgelesen werden, die sowohl die gentechnisch eingefügten Gene für das frühzeitige Blühen als auch die gewünschten genetischen Eigenschaften enthalten. (6) Die selektierten BC<sub>1</sub>-Pflanzen werden wiederum mit der gentechnisch nicht-veränderten Elternpflanze gekreuzt, in welche die gewünschten genetischen Eigenschaften eingekreuzt werden soll. (7) Die Pseudo-Rückkreuzung wird so oft wiederholt, bis die ungewünschten genetischen Eigenschaften, die durch die Kreuzung mit in das Erbgut eingebracht worden sind, schrittweise entfernt sind. (8) Sind die ungewünschten genetischen Eigenschaften eliminiert, werden schliesslich die Pflanzen selektiert, welche die gewünschten genetischen Eigenschaften besitzen, nicht aber die gentechnisch eingefügten Konstrukte.

<sup>10</sup> Da die F<sub>1</sub>-Nachkommen nicht mit einem ihrer Elternpaare rückgekreuzt werden, sondern mit der nicht-gentechnisch veränderten Ausgangspflanze, geht es hier nicht um eine «echte» Rückkreuzung sondern um eine Pseudo-Rückkreuzung.

### *3.6.1.2 Induktion der Blühverfrühung mittels VIGS und VUGE*

Diese Strategie basiert darauf, den Auslöser für die Blühverfrühung mit Hilfe rekombinanter Pflanzenviren vorübergehend in die Pflanzenzellen einzuschleusen. Falls die Blühverfrühung via die Stilllegung endogener Gene erfolgen soll, werden die viralen Vektoren mit hpRNA-Konstrukten ausgestattet (VIGS; Abschnitt 3.2.1). In den anderen Fällen werden Expressionskassetten in den Vektor eingebracht (VUGE, Abschnitt 3.11.8). Die VIGS- beziehungsweise VUGE-inokulierten Pflanzen dienen schliesslich als Kreuzungspartner. Falls virale Vektoren eingesetzt werden, die nicht via Samen übertragen werden, sind die Kreuzungsnachkommen frei von den extrazellulär eingeführten Sequenzen (Abschnitt 3.2.1).

### *3.6.1.3 Induktion der Blühverfrühung mittels Pfropfen*

Da Proteine und siRNAs vom Wurzelstock in den aufgepfropften Reiser transportiert werden können (siehe dazu Abschnitt 3.10.5.2), besteht eine weitere Strategie der Beschleunigten Züchtung darin, Reiser auf einen Wurzelstock zu pflanzen, der mit Expressionskassetten oder RNAi-Konstrukten transformiert worden ist. Durch den Transport der Proteine beziehungsweise siRNAs soll in den Reisern eine Blühverfrühung ausgelöst werden. Die früh blühenden Reiser können dann als Kreuzungspartner eingesetzt werden. Da kein genetisches Material vom Wurzelstock in die generativen Teile der Reiser transportiert werden dürfte (Abschnitt 3.9.5), sind die Kreuzungsnachkommen frei von extrazellulär eingeführten Sequenzen.

## **3.6.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht**

Die Beschleunigte Züchtung ist insbesondere für die Züchtung neuer Obst- und Forstbaumsorten von Interesse. Im Vergleich zur Sortenzüchtung bei einjährigen Pflanzen dauert die Erzeugung neuer Sorten bei Bäumen sehr lange. Da Obst- und Forstbäume erst spät zu ersten Blüte kommen und sehr lange leben, könnten bestimmte Eigenschaften mit der klassischen Kreuzungszüchtung erst nach vielen Jahrzehnten oder gar nicht in neuen Sorten realisiert werden (Flachowsky et al. 2011, Fladung 2011). Um beispielsweise eine neue Apfelsorte zu züchten, die genetische Eigenschaften von Wildäpfeln aufweisen soll, können mehr als 50 Jahre Züchtungsarbeit notwendig sein (Flachowsky et al. 2011). Indem das Verfahren der beschleunigten Züchtung dazu genutzt werden kann, die vegetative Phase der Bäume auf wenige Monate zu verkürzen und somit die erste Blüte vorzuzuschieben, kann im Züchtungsprozess Zeit eingespart werden.

Neben dem Einsatz bei der Züchtung neuer Obst- und Forstbaumsorten wird die Beschleunigte Züchtung auch bei einjährigen Pflanzen verwendet, um den Züchtungsprozess abzukürzen (Yamagishi & Yoshikawa 2011a/b).

## **3.6.3 Stand der Entwicklung**

Forschungsprojekte zu früh blühenden Bäumen gab und/oder gibt es bei verschiedenen Arten, dazu gehören Apfel (Le Roux et al. 2012, Flachowsky et al. 2011/2007/2006, Yamagishi et al. 2011, Tränkner et al. 2010, Zhu et al. 2009, Kotada et al. 2006), Aspen (Weigel & Nilsson 1995), Birne (Freiman et al. 2012, Matsuda et al. 2006), Bitterorange (Endo et al. 2005), Pappel (Tränkner et al. 2010, Zhang et al. 2010a, Böhlenius et al. 2006, Hsu et al. 2006), Pflaume (Srinivasan et al. 2012), Kumquat (Duan et al. 2010) und Zitrusbäume (Cervera et al. 2009, Pena et al. 2001). Forschungsprojekte bei einjährigen Pflanzen gibt es beispielsweise bei Soja (Yamagishi & Yoshikawa 2011a/b) und Tabak (Lewis & Kernodle 2009).

Laut Schaart & Visser (2009) steckt das neue Züchtungsverfahren noch in der Forschungsphase, weshalb kurzfristig nicht mit marktfähigen Produkten zu rechnen sein dürfte.

### 3.6.4 Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen

Bei Sorten aus der Beschleunigten Züchtung, die frei von extrazellulär eingeführten Sequenzen sind, besteht die beabsichtigte genetische Veränderung darin, ein oder mehrere Gene beziehungsweise ein oder mehrere QTLs von einer Sorte/Wildpflanze in eine andere Sorte einzukreuzen. Die beabsichtigte Wirkung durch die Gene beziehungsweise QTLs bestimmt, die absichtlich eingekreuzt werden.

### 3.6.5 Beabsichtigte/unbeabsichtigte Wirkungen

Bei Sorten aus der Beschleunigten Züchtung, die frei von extrazellulär eingeführten Sequenzen sind, können folgende unbeabsichtigten Veränderungen und Wirkungen auftreten:

Linkage drag: Wie bei jeder Kreuzung werden neben den beabsichtigten Genen zusätzlich noch weitere DNA-Sequenzen aus dem Spendergenom mit eingekreuzt.

Somaklonale Variation: Wird die Blühverfrühung mittels Transformation induziert, sind unbeabsichtigte genetische Veränderungen möglich, da die Methode einen In-vitro-Schritt beinhaltet und somit somaklonale Variationen auftreten können. Somaklonale Variationen umfassen sowohl genetische wie auch epigenetische Veränderungen im Erbgut, können bei allen aus In-vitro-Kulturen regenerierten Pflanzen auftreten (Bairu et al. 2011) und sind bei der Transformation vielfach beobachtet worden (z.B. Mori et al. 2007, Bubner et al. 2006, Goldman et al. 2004, Ellul et al. 2003, Heeres et al. 2002, Labra et al. 2001, Sala et al. 2000, Arencibia et al. 1999, Bregitzer et al. 1998, Veilleux & Johnson 1998). Zu den möglichen Veränderungen, die in aus In-vitro-Kulturen regenerierten Pflanzen beobachtet werden können, gehören Änderungen in der Chromosomenzahl und -struktur, Basensubstitutionen, Indels, Aktivierung von transponierbaren Elementen und Änderungen in der DNA-Methylierung (Neelakandan & Wang 2012, Jiang et al. 2011, Miguel & Marum 2011, Jain 2001). Das Ausmass der Veränderungen kann von einer Reihe von Faktoren abhängen wie beispielsweise dem Genotypen, dem In-vitro-System, der Genomgrösse, dem Alter der Kultur und den Wachstumshormonen im Nährmedium (Bairu et al. 2011).

Methylierung der Zielsequenz: In den Fällen, in denen die Blühverfrühung durch das Stilllegen endogener Gene induziert wird, ist es denkbar, dass die RNAi zu einer RNA-dirigierten DNA-Methylierung der Zielsequenz führt. Das dabei neu eingeführte Methylierungsmuster kann unter Umständen an die Nachkommen weitervererbt werden (Schaart & Visser 2009). Fände eine vererbliche DNA-Methylierung der Zielsequenz statt, könnten die Sorten einen früh blühenden Phänotyp aufweisen.

Methylierung von Nicht-Zielsequenzen: In den Fällen, in denen die Blühverfrühung durch das Stilllegen endogener Gene induziert wird, ist es denkbar, dass die RNAi zu einer RNA-dirigierten DNA-Methylierung von Nicht-Zielsequenzen führt. In den Fällen, in denen die Blühverfrühung mittels Transformation erfolgt, kann es zudem durch den In-vitro-Kulturschritt zur Methylierung endogener Sequenzen kommen. Die neu eingeführten Methylierungsmuster können unter Umständen an die Nachkommen weitervererbt werden und zur Änderung der Expression von Nicht-Zielgenen führen.

Pleiotrope Effekte: Die Produkte der eingekreuzten Gene beziehungsweise QTLs können einen pleiotropen Effekt haben und somit unbeabsichtigt Merkmale der Empfängerpflanze beeinflussen, die in keiner Beziehung zur beabsichtigten Wirkung stehen.

### 3.6.6 Sicherheitsaspekte

Im Folgenden werden Aspekte aufgeführt, die bei der Bewertung der Sicherheit von Sorten aus der Beschleunigten Züchtung eine Rolle spielen könnten und zwar für den Fall, dass die Sorten

nachweisbar frei von den während des Züchtungsprozesses extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen sind. Es wird kein Anspruch darauf erhoben, alle möglichen und denkbaren sicherheitsrelevanten Aspekte zu behandeln.

Quelle der eingekreuzten Gene: Die bei der Beschleunigten Züchtung einkreuzbaren Gene können sowohl aus dem primären und sekundären als auch tertiären Genpool einer Sorte stammen (siehe Abschnitt 3.6.1). Hinsichtlich der Bewertung der Sicherheit der Genprodukte sind dabei zwei Fälle zu unterscheiden: (I) Die Gene beziehungsweise Genprodukte sind bereits Bestandteil der menschlichen und tierischen Ernährung und/oder Bestandteil des Agrarökosystems, indem die resultierende Sorte angebaut werden soll. (II) Die Gene beziehungsweise Genprodukte sind bisher nicht Bestandteil der menschlichen und tierischen Ernährung und/oder Bestandteil des Agrarökosystems, indem die resultierende Sorte angebaut werden soll. Während im ersten Fall Erfahrungen zur Sicherheit des neu gebildeten Proteins bestehen, fehlen diese Erfahrungen im zweiten Fall

Linkage drag: Die zusammen mit dem Zielgen eingekreuzten DNA-Sequenzen können ineffektiv bleiben, erwünschte Auswirkungen haben oder unerwünschte Wirkungen zeigen. Da die Beschleunigte Züchtung mehrere Rückkreuzungsschritte beinhalten kann, kann der *linkage drag* während des Züchtungsprozesses weitgehend eliminiert werden. Inwieweit Pflanzen mit unerwünschtem *linkage drag* während des Züchtungsprozesses aussortiert werden, hängt unter anderem auch ab von der Manifestation des *linkage drag* sowie der Wahl der Selektionsmethoden. Der Co-Transfer von DNA-Sequenzen, die an die Zielgene gekoppelt sind, ist ein Prozess, der auch mit der herkömmlichen Kreuzungszüchtung normalerweise einhergeht.

Somaklonale Variationen: Somaklonale Variationen sind in den Fällen zu berücksichtigen, in denen die Blühverfrühung mittels Transformation erzielt wird (Abschnitt 3.6.1.1). Somaklonale Variationen können ineffektiv bleiben und erwünschte Auswirkungen haben. Sie können auch unerwünschte Wirkungen verursachen und deshalb sicherheitsrelevant sein. Inwieweit Pflanzen mit somaklonalen Variationen während des Züchtungsprozesses aussortiert beziehungsweise weiterverwendet werden, hängt unter anderem ab von Wahl der Primärtransformanten, der Manifestation der somaklonalen Variationen sowie der Wahl der Selektionsmethoden. Da die Beschleunigte Züchtung mehrere Rückkreuzungsschritte beinhalten kann, können Somaklonale Variationen während des Züchtungsprozesses weitgehend eliminiert werden. Somaklonale Variationen können auch bei anderen Züchtungsverfahren auftreten, wie beispielsweise der In-vitro-Mutagenese. Zudem werden sie beim Zuchtverfahren der somaklonalen Selektion gezielt zur Herstellung neuer Sorten verwendet (Singh & Shetty 2011, Veilleux & Johnson 1998).

Veränderter Gehalt endogener Proteine und/oder endogener Metabolite: In den Fällen, in denen die Blühverfrühung via Transformation und/oder mittels RNAi-Konstrukten induziert wird, kann eine unbeabsichtigte Methylierung von Nicht-Zielsequenzen und somit eine Änderungen in der Expression von Nicht-Zielgenen erfolgen. Änderungen in der Genexpression können zu einer erhöhten Produktion bestimmter endogener Proteine und/oder Metabolite führen, was ohne Auswirkungen bleiben, unerwünschte Wirkungen zeigen oder erwünschte Folgen haben kann. Inwieweit Pflanzen mit unbeabsichtigten Epiallelen während des Züchtungsprozesses aussortiert oder weiterverwendet werden, hängt unter anderem ab von der Manifestation der Expressionsänderungen und der Wahl der Selektionsmethoden. Unbeabsichtigte Methylierungen können auch spontan auftreten (Manning et al. 2006, Cubas et al. 1999), mit Gewebekulturtechniken verbunden sein (Rhee et al. 2010, Krizova et al. 2009) oder mittels Chemikalien ausgelöst werden (Fieldes et al. 2005). Änderungen in der Expression endogener Gene können durch Umwelteinflüsse ausgelöst werden (Dong et al. 2012, Fernandez et al. 2008, Joosen et al. 2006, Gulick et al.



2005) und kommen auch bei herkömmlichen Züchtungsverfahren vor (z.B. Swanson-Wagner et al. 2009/2006, Zhuang & Adams 2007, Wang et al. 2006b).

Pleiotrope Effekte: Ein pleiotroper Effekt kann ohne Auswirkungen bleiben, unerwünschte Wirkungen zeigen oder erwünschte Folgen haben. Ob Pflanzen mit unerwünschtem pleiotropen Effekt während des Züchtungsprozesses aussortiert oder weiterverwendet werden, hängt unter anderem von der Manifestation des Effekts und der Wahl der Selektionsmethoden ab. Pleiotrope Effekte treten auch bei herkömmlichen Kreuzungszüchtungsverfahren und der Transgenese auf (z.B. Ravel et al. 2009, Uauy et al. 2006, Ge et al. 2004, Gutierrez-Campos et al. 2001, Thompson et al. 1999).

Früh blühender Phänotyp: Sorten mit früh blühendem Phänotyp könnten in den Fällen auftreten, in denen die Blühverfrühung mittel RNAi-Konstrukten induziert wird und eine unbeabsichtigte Methylierung der Zielsequenzen stattfindet. Früh blühende Phänotypen können erkannt und aussortiert werden.

### **3.6.7 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden<sup>11</sup>**

Erkennung: In den gesichteten Materialien sind keine Angaben zur Erkennung von Sorten aus der Beschleunigten Züchtung gefunden worden. Da Sorten aus der Beschleunigten Züchtung neue, eingekreuzte Gene aufweisen, dürften die Gene jedoch mit PCR-Methoden zu erkennen sein, falls Vorwissen zu den eingekreuzten Genen vorliegt.

Identifikation: In den gesichteten Materialien sind keine Angaben zur Identifikation von Sorten aus der Beschleunigten Züchtung gefunden worden. Da Sorten aus der Beschleunigten Züchtung die gleichen eingekreuzten Gene enthalten können wie Sorten, die aus einer herkömmlichen Kreuzung stammen, dürfte eine eindeutige Identifizierung schwierig sein.

### **3.6.8 Aspekte der GVO-Klassierung**

Im Folgenden werden Aspekte diskutiert, die bei GVO-Klassierung von Sorten aus der Beschleunigten Züchtung eine Rolle spielen könnten, wenn die Sorten nachweisbar frei von den während des Züchtungsprozesses eingeführten Sequenzen sind. Die Diskussion erfolgt für folgende drei Fälle: (I) Induktion der Blühverfrühung mittels Transformation, (II) Induktion der Blühverfrühung mittels virale Vektoren (VIGS/VUGE), und (III) Induktion der Blühverfrühung mittels Pfropfen (siehe dazu Abschnitt 3.6.1).

#### *3.6.8.1 Induktion der Blühverfrühung mittels Transformation*

Wird die Blühverfrühung mittels Transformation ausgelöst (Abschnitt 3.6.1.1), erfolgt am Schluss des Züchtungsprozesses eine Segregation der extrazellulär eingeführten genetischen Konstrukte. Die Null-Segregante (in Bezug auf die eingeführten Konstrukte) wirkt dabei als Ausgangsmaterial für die weitere Nutzung und Vermehrung. Damit stellt sich die Frage, ob Kreuzungsnachkommen einer stabil transformierten Pflanze als GVO gelten, wenn sie frei vom ursprünglich transformierten genetischem Material sind? Weder GTG noch FrSV geben hierzu eine konkrete Antwort. Ausserhalb der Gentechnikgesetzgebung finden sich hingegen Bestimmungen, die auf die gestellte Frage eingehen. Art. 9a Abs. 2 Vermehrungsmaterial-Veordnung hält dazu fest: Wird eine gentechnisch veränderte Sorte zur Züchtung verwendet, so gelten die davon abstammenden Sorten ebenfalls als gentechnisch verändert, ausser wenn nachgewiesen ist, dass sie die gentechnische Veränder-

---

<sup>11</sup> Mit Erkennung ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte festzustellen und zwar in Bezug auf eine geeignete Vergleichssorte. Mit Identifikation wiederum ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte als Veränderung zu erkennen, die absichtlich durch ein bestimmtes Verfahren eingeführt worden ist.

ung nicht mehr enthalten. In Art. 2 Bst. d der Verordnung des EDI über gentechnisch veränderte Lebensmittel (VGVL) steht hingegen, dass Organismen, die aus einer Kreuzung von GVO mit einem anderen Organismus hervorgehen, als GVO gelten. Ein Bezug auf das Vorhandensein der gentechnischen Veränderung wird hier nicht genommen.

Da weder GTG noch FrSV eine konkrete Antwort darauf geben, wie Null-Segreganten zu klassieren sind, lässt sich fragen, wie die Null-Segreganten im Lichte von Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV zu betrachten sein könnten. Da die Transformation gemäss FrSV ein gentechnisches Verfahren ist, lässt sich unter einer Prozess-bezogenen Sichtweise argumentieren, dass die entstehenden Sorten als GVO zu klassieren sind, weil sie eine Veränderung am genetischen Material aufweisen, die auf eine gentechnische und somit natürlicherweise nicht vorkommende Methode zurückgeht. Aus einer Produkt-bezogenen Sichtweise wiederum kann argumentiert werden, dass die resultierenden Sorten nicht als GVO zu klassieren sind, da die Veränderung am genetischen Material auch unter natürlichen Bedingungen durch Kreuzung erzeugt werden kann.

Da bei der Induktion der Blühverfrühung mittels Transformation nicht auszuschliessen ist, dass die resultierenden Sorten aufgrund somaklonaler Variationen (Abschnitt 3.6.4.2) auch unbeabsichtigte Veränderungen in ihrem genetischen Material aufweisen, könnte zu klären sein, ob solche Veränderungen einen Einfluss auf die GVO-Klassierung haben oder nicht. Zu beachten sein könnte bei dieser Klärung auch Anhang 1 Abs. 3 Bst. a FrSV. Dort wird festgehalten, dass die Mutagenese kein gentechnisches Verfahren ist. Da somaklonale Variationen auch bei gewissen Anwendungen der Mutagenese auftreten können, gilt somit implizit, dass die Erzeugung somaklonaler Variationen an und für sich nicht als gentechnische Veränderung gemäss FrSV gilt. Anhang 1 Abs. 3 FrSV hält nun jedoch des Weiteren fest, dass die Mutagenese dann ein gentechnisches Verfahren ist, wenn sie mit dem Einsatz von GVO oder rekombinanten Nukleinsäuren verbunden ist. Wird hier die somaklonale Variation wiederum implizit mitgedacht, so stellt sich die Frage, ob die Sorten aus der Beschleunigten Züchtung, die somaklonale Variationen aufweisen, als GVO zu klassieren sind, weil das Verfahren mit dem Einsatz von GVO verbunden ist. Gemäss erläuternden Bericht zur FrSV (EDI 1997) kann der Ausdruck «mit dem Einsatz von GVO» so verstanden werden, dass die eingesetzten Organismen bereits bei Beginn des Verfahrens gentechnisch verändert sind.

Da beim RB-Verfahren auch unbeabsichtigter Methylierungen und somit neue Epiallele auftreten könnten, stellt sich wie bei den somaklonalen Variationen die Frage, ob sie einen Einfluss auf die GVO-Klassierung haben könnten. Gemäss Wortlaut von Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV spielen bei der Legaldefinition von GVO nicht «genetische Veränderungen» eine Rolle, sondern «Veränderungen des genetischen Materials». Wissenschaftlich betrachtet sind Epiallele keine genetischen, sondern epigenetische Veränderungen; sie könnten aber als Veränderung des genetischen Materials angesehen werden (siehe dazu auch Abschnitt 3.4.8).

#### *3.6.8.2 Induktion der Blühverfrühung mittels VIGS/VUGE*

Wird die Blühverfrühung mittels VIGS oder VUGE ausgelöst (Abschnitt 3.6.1.2), so entsteht aus den Nachkommen einer Pflanze, die einen GVO enthält, die gewünschte Sorte. Anders als bei der Induktion mittels Transformation resultiert die Sorte somit aus einem Erbgut, in welches nie extrazellulär eingeführte Sequenzen inseriert worden sind. Falls Pflanzen, die einen rekombinanten Virus enthalten, selbst als GVO zu klassieren sind, würde sich wie unter 3.6.8.1 die Frage stellen, wie Kreuzungsnachkommen zu klassieren sind. Falls VIGS- oder VUGE-behandelte Pflanzen selbst nicht als GVO gelten, kann argumentiert werden, dass deren Nachkommen ein Kreuzungsprodukt aus nicht gentechnisch veränderten Pflanzen sind und somit nicht als GVO zu klassieren sein sollten.

Ob Nachkommen von Pflanzen, die rekombinante Viren enthielten, als GVO zu klassieren sind oder nicht, wenn sie frei vom rekombinanten Virus sind, wird weder im GTG noch in der FrSV konkret beantwortet. Hinsichtlich Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV könnten wiederum die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Prozess- und Produkt-bezogenen Sichtweisen zur Geltung kommen.

#### *3.6.8.3 Induktion der Blühverfrühung mittels Pfropfen*

Wird die Blühverfrühung mittels Pfropfen ausgelöst (Abschnitt 3.6.1.3), so entsteht aus den Nachkommen eines gentechnisch nicht veränderten Reisers die gewünschte Sorte. Wie bei der Induktion der Blühverfrühung mittels VIGS oder VUGE resultiert die Sorte somit aus einem Erbgut, in welches nie extrazellulär eingeführte Sequenzen inseriert worden sind.

Falls eine Pfropfchimäre rechtlich als eine Pflanze gälte, wäre der Reiser ein GVO, weshalb sich wie unter 3.6.8.1 die Frage stellen würde, wie Kreuzungsnachkommen zu klassieren sind. Gälte die Chimäre hingegen als zwei Pflanzen, wäre der Reiser kein GVO, weshalb auch seine Nachkommen nicht als GVO zu klassieren wären.

Ob Nachkommen eines Reisers, der auf einen stabil transformierten Wurzelstock gepfropft ist, als GVO zu klassieren sind oder nicht, wird weder im GTG noch in der FrSV konkret beantwortet (vgl. 3.9.8). Hinsichtlich Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV könnten bei der GVO-Klassierung der Nachkommen wiederum die in Abschnitt 3.6.8.1 beschriebenen Prozess- und Produkt-bezogenen Sichtweisen diskutiert werden.

### **3.7 Cisgenese**

Die Cisgenese ist ein neues Konzept zur Transformation von Pflanzen. Im Gegensatz zur Transgenese, bei der Gene zwischen x-beliebigen Arten ausgetauscht werden, beinhaltet das Konzept der Cisgenese, dass Pflanzen nur mit arteigenen Genen oder mit Genen von nah verwandten, sexuell kompatiblen Arten transformiert werden (Holme et al. 2012, Lusser et al. 2012, Vanblaere et al. 2011). Die transformierten Gene liegen dabei in ihrer natürlichen Orientierung vor, besitzen ihre eigenen Introns und sind von ihren nativen Promotoren und Terminatoren flankiert (Holme et al. 2012, Molesini et al. 2012, Lusser et al. 2011, Vanblaere et al. 2011, Prins & Kok 2010, Schaart & Visser 2009, Schouten et al. 2006a/b). In Tabelle 2 sind die wesentlichen Unterscheidungsmerkmale zwischen der Transgenese und der Cisgenese dargestellt.

#### **3.7.1 Beschreibung des Verfahrens**

Bei der Cisgenese wird das Erbgut von Pflanzen mit einem oder mehreren Cisgenen transformiert. Cisgene sind Gene aus dem natürlichen Genpool der zu transformierenden Pflanze, das heisst, sie stammen entweder von der Art selbst oder von einer verwandten, kreuzungskompatiblen Art. Cisgene werden aus einer Pflanzenzelle isoliert und dann unverändert in das Erbgut einer anderen Pflanzenzelle eingefügt. Ein weiteres Merkmal von Cisgenen ist deshalb: Sie liegen in *sense*-Orientierung vor, besitzen ihre Introns und sind von ihren Promotoren und Terminatoren flankiert (Abbildung 6).

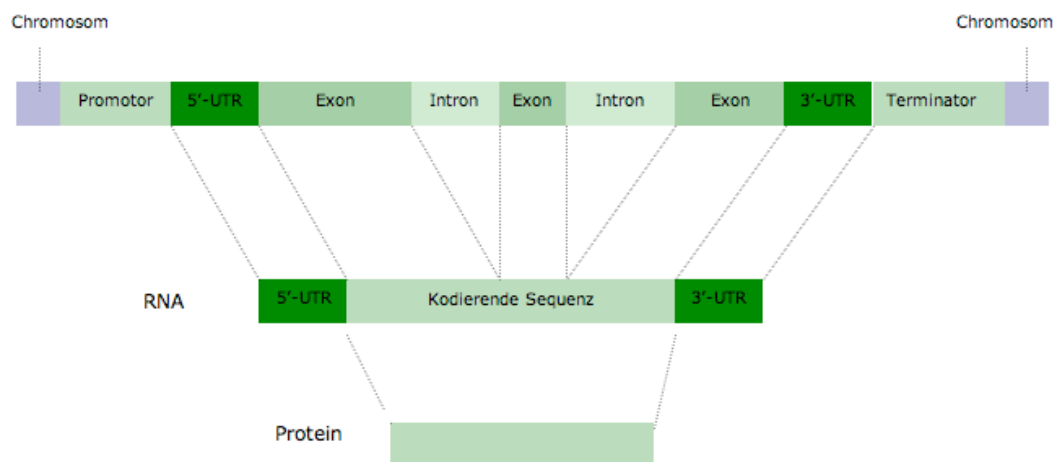
Cisgene werden mit den gleichen Gentransfermethoden in das Erbgut eingefügt, die bei der Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen üblicherweise verwendet werden, wobei der Transfer der Cisgene gegenwärtig hauptsächlich mit Hilfe von Agrobakterien erfolgt. Neben den etablierten Transformationsmethoden können auch die NRE-Techniken zur Herstellung cisgener Pflanzen eingesetzt werden (siehe Abschnitte 3.10, 3.11.1 und 3.11.2).

**Tabelle 2: Transgenese und Cisgenese – zwei unterschiedliche Strategien zur Transformation von Pflanzen (nach Molesini et al. 2012).**

	<b>Transgenese</b>	<b>Cisgenese</b>
Quelle der kodierenden DNA-Sequenzen	Alle Arten	Dieselbe Art oder kreuzungs-kompatible Art
Quelle der regulatorischen DNA-Sequenzen	Alle Arten	Dieselbe Art oder kreuzungs-kompatible Art
Typ des genetischen Konstruktes	Neue Kombinationen von kodierenden und regulatorischen Sequenzen	Perfekte Kopie des natürlichen Gens
Orientierung der exprimierten Sequenz	<i>Sense</i> - oder <i>antisense</i> -Orientierung, Haarnadel-Konstrukte	<i>Sense</i> -Orientierung
T-DNA Grenzsequenzen	Linke und rechte Grenzsequenzen der <i>Agrobacterium</i> T-DNA	?
Selektierbare Markergene	Marker vorhanden	Keine oder cisgene Marker vorhanden

? Ob cisgene Pflanzen die linken und rechten Grenzsequenzen der T-DNA enthalten dürfen oder nicht, wird von den Akteuren unterschiedlich beantwortet (Lusser et al. 2011; siehe Abschnitt 3.7.1.1).

Da cisgene Pflanzen per Definition keine artfremden Gene enthalten sollen, muss ihre Herstellung so erfolgen, dass sie entweder einen cisgenen Marker besitzen (Rosellini 2011) oder frei von Markergenen sind. Für die Herstellung Marker-freier cisgener Pflanzen stehen unterschiedliche Strategien zur Verfügung. Einerseits ist es möglich, Pflanzen direkt ohne Markergene zu transformieren (siehe Beispiele in Tuteja et al. 2012 und Manimaran et al. 2011). Andererseits gibt es verschiedene Verfahren, Markergene aus transformierten Pflanzen zu entfernen (Übersichten in Tuteja et al. 2012, Manimaran et al. 2011, Upadhyaya et al. 2010, Darbani et al. 2007).



**Abbildung 6:** Struktur eines typischen Pflanzengens. Das Gen ist Teil eines Chromosoms und besteht aus Promotor und Terminator, 5'- und 3'-nicht translatierten Regionen (UTR) sowie Exons und Introns. Promotor und Terminator sind regulatorische Sequenzen. Die Exons können bei der Transkription fusioniert und dann in ein Protein translatiert werden. Abbildung nach Schaart & Visser (2009).

### 3.7.1.1 Definitive Aspekte

Die Cisgenese ist ein Konzept, das in der Literatur unterschiedlich definiert wird (siehe Prins & Kok 2010). Unabhängig von den jeweiligen Definitionen gibt es einige Aspekte, die es gegenwärtig weitgehend verhindern, auf eine «hieb- und stichfeste» Art und Weise festzulegen, was Cisgenese ist (Prins & Kok 2010). Die Aspekte, die bei der Definition der Cisgenese zu einer «grauen Zone» (Prins & Kok 2010) führen könnten, sind im Folgenden aufgeführt.

Zeitpunkt der Definition: Unklar ist gegenwärtig, an welchem Punkt des Prozesses die Definition angewandt werden soll. Bezieht sich die Definition auf die beabsichtigte genetischen Veränderung oder nur auf die Veränderung, die tatsächlich in der Pflanze stattgefunden hat (Prins & Kok 2010).

Kodonveränderungen: Ist die Sequenz eines Cisgens bekannt, so ist es grundsätzlich möglich, das Cisgen synthetisch herzustellen und dabei die Sequenz an die Kodonvorlieben der zu transformierenden Pflanze anzupassen. Inwiefern synthetische Gene mit optimierten Kodons unter die Definition der Cisgenese fallen oder nicht, ist unklar (Prins & Kok 2010).

Insertion partieller Cisgene: Bei der Transformation von Pflanzen mit Cisgenen ist es möglich, dass es neben der Insertion ganzer Cisgene auch zur Insertion von Bruchstücken und zu Rearrangements kommt. Ob Pflanzen mit solchen Bruchstücken und/oder Rearrangements als cisgen gelten können, ist unklar (Prins & Kok 2010).

Quelle der Cisgene: Was die Quelle der Cisgene betrifft, werden bei den unterschiedlichen Definitionen der Cisgenese verschiedene Begriffe verwendet: Cisgene können aus dem «natürlichen Genpool» einer Pflanze stammen oder aus dem «Genpool der Züchter» (*breeder's gene pool*) oder von «kreuzbaren Arten» oder von «sexuell kompatiblen Arten». Zu klären sein könnten dabei folgende Fragen: Können Gene, die sich allein via eine Brückenkreuzung in eine Pflanze einkreuzen lassen, als Cisgene eingesetzt werden? Können Gene, die sich allein via Weite Kreuzungen und *embryo-rescue*-Verfahren in eine Pflanze übertragen lassen, als Cisgene verwendet werden? Hängt die Antwort auf die beiden Fragen davon ab, ob die Gene bereits via Brückenkreuzung oder Weite Kreuzung übertragen worden sind und somit im Erbgut einer «direkt» kreuzbaren Art vorliegen?

Transfer von Organellen-Genen: Zusätzlich zum Erbgut des Zellkerns besitzen Pflanzen auch die Organellen-Genome der Plastiden und Mitochondrien. Gene aus den Organellen-Genomen lassen sich mit den etablierten Transformationstechniken ebenfalls transferieren. Inwiefern und in welchen Fällen solche Gene als Cisgene definiert werden könnten, bleibt zu diskutieren (Prins & Kok 2010). EFSA (2012a) betrachtet den Transfer von Organellen-Genen zwischen kreuzbaren – sexuell kompatiblen – Pflanzenarten als Cisgenese, wenn die Gene in das gleiche Organell integriert werden, aus dem sie stammen.

Insertion «überflüssiger» Sequenzen: Mit den gängigen Transformationsmethoden können zusammen mit den Cisgenen auch noch weitere Sequenzen ins Erbgut einer Pflanze inseriert werden. Zu diesen Sequenzen können folgende gehören: Vektor-Rückgrat-Sequenzen (Gelvin 2003), Sequenzen aus dem chromosomalen Erbgut von Agrobakterien (Ulker et al. 2008), Grenzsequenzen der T-DNA (Holme et al. 2012) synthetische Sequenzen (z.B. multiple Klonierungsstellen, die sich innerhalb der T-DNA befinden; Holme et al. 2012) sowie Erkennungssequenzen von Rekombinasen, die bei bestimmten Methoden zur Entfernung von Markergenen im Erbgut der Pflanze zurückbleiben können (beim *Cre/loxP*-Rekombinationssystem bleibt eine einzelne *loxP*-Sequenz zurück; z.B. Terada et al. 2010). In den Fällen, in denen überflüssige Sequenzen nicht mit dem Cisgen verlinkt sind, können die Sequenzen via Segregation entfernt werden. Ist eine Segregation nicht möglich, verbleiben die überflüssigen Sequenzen im Erbgut. Damit kann sich in gewissen Fällen die Frage stellen, wie das Vorkommen überflüssiger Sequenzen hinsichtlich der Definition der Cisgenese zu beurteilen ist. Da es sich in den meisten Fällen um kurze Sequenzen handelt, dürften

sich dazu im Erbgut der transformierten Pflanze homologe oder weitgehend homologe Sequenzen finden lassen, weshalb die Sequenzen wiederum als arteigen betrachtet werden könnten.

Hinsichtlich der möglicherweise in cisgenen Pflanzen vorkommenden überflüssigen Sequenzen wird in der Literatur hauptsächlich das Vorkommen von Grenzsequenzen der T-DNA diskutiert. Dabei wird zuweilen auch explizit zwischen «Cisgenese» und «Cisgenese mit T-DNA-Grenzsequenzen» unterschieden (z.B. EFSA 2012a, NTWG 2011).

### **3.7.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht**

Die Cisgenese wird in der Pflanzenzüchtung eingesetzt, um bestehende Sorten genetisch zu verbessern. Da die Gene, die dabei benutzt werden, aus dem natürlichen Genpool der Sorte stammen, beruht die Cisgenese auf demselben genetischen Material, das auch bei der Kreuzungszüchtung von sexuell kompatiblen Pflanzen verwendet wird. Im Vergleich zur Kreuzungszüchtung bietet die Cisgenese jedoch den Vorteil, dass die gewünschten Gene ohne *linkage drag* übertragen werden können (Lusser et al. 2012, Jacobsen & Schouten 2009). Die Cisgenese kann somit die Züchtung beschleunigen, da die langwierige Rückkreuzung zur Entfernung des *linkage drag* entfällt. Diese Zeiteinsparung ist vor allem bei Kulturarten von Bedeutung, die vegetativ vermehrt werden oder eine lange Generationszeit haben (Lusser et al. 2011, Schaart & Visser 2009). Zudem könnte sie auch in den Fällen eine wichtige Rolle spielen, in denen Resistenzgene pyramidiert werden sollen (Lusser et al. 2011).

Zu den Eigenschaften, die mittels Cisgenese in einer Sorte verbessert werden könnten, gehören unter anderem: Erhöhung der Krankheitsresistenz, veränderte Pflanzenarchitektur und verbesserte Futtermittelcharakteristika (Holme et al. 2012, Han et al. 2011, Vanblaere et al. 2011).

### **3.7.3 Stand der Entwicklung**

Das Konzept der Cisgenese ist 2004 erstmals formuliert worden (Schaart 2004). Seither sind in der Literatur vereinzelt cisgene Pflanzen beschrieben worden (Holme et al. 2012, Vanblaere et al. 2011). Zu den Kulturarten, bei denen die Cisgenese erprobt oder diskutiert wird, gehören Apfel (Joshi et al. 2011, Vanblaere et al. 2011, Szanowski et al. 2009), Gerste (Holme et al. 2012), Kartoffel (Park et al. 2009), Melone (Benjamin et al. 2009), Pappel (Han et al. 2011), Weinrebe (Dhekney et al. 2011) und Weizen (Gadaleta et al. 2008).

In der EU werden gegenwärtig mindestens drei cisgene Sorten in Freisetzungsversuchen getestet: Schorf-resistente Äpfel, Phytophthora-resistente Kartoffeln und Gerste mit verbesserter Phytaseaktivität (JRC 2012).

Lusser et al. (2011) gehen davon aus, dass erste cisgene Pflanze innerhalb der nächsten drei Jahre kommerzialisiert werden könnten, falls sie rechtlich nicht als GVO klassiert werden.

### **3.7.4 Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen**

Die beabsichtigte genetische Veränderung besteht darin, ein oder mehrere Cisgene in das Erbgut einer Pflanze zu inserieren. Die beabsichtigte Wirkung in cisgenen Pflanzen wird durch das inserierte Cisgen/die inserierten Cisgene bestimmt.

### **3.7.5 Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen**

Zu den möglichen unbeabsichtigten Veränderungen und Wirkungen der Cisgenese gehören:

Insertionsmutationen: Mit den etablierten Transformationsmethoden ist es nicht möglich, Cisgene an einen vorbestimmten Ort im Genom zu inserieren (Somers & Makarevitsch 2004). Da die Insertion damit weitgehend zufällig erfolgt, können Cisgene unabsichtlich in Sequenzbereiche von aktiven Genen, Promotoren oder andere regulativen Elementen integrieren und somit Insertions-

mutationen erzeugen (Prins & Kok 2010, Schaart & Visser 2009, Filipecki & Malepszy 2006, Latham et al. 2006) Die Erzeugung mehrerer solcher Mutationen kann dann erfolgen, wenn bei der Transformation gleichzeitig mehrere Cisgene oder Bruchstücke davon an unabhängigen Orten im Erbgut inseriert werden (siehe dazu Filipecki & Malepszy 2006, Latham et al. 2006, Cellini et al. 2004). Insertionsmutationen könnten des Weiteren entstehen, weil der Prozess der Transformation transponierbare Elemente aktivieren kann (Wu et al. 2009, Bhatt et al. 1998).

Somaklonale Variationen: Beinhaltet die für die Herstellung einer cisgenen Pflanze eingesetzte Transformationstechnik einen In-vitro-Selektions- und Regenerationsschritt, so kann es im Erbgut der transformierten Pflanze zu somaklonalen Variationen kommen. Somaklonale Variationen umfassen sowohl genetische wie auch epigenetische Veränderungen im Erbgut, können bei allen aus In-vitro-Kulturen regenerierten Pflanzen auftreten (Bairu et al. 2011) und sind bei der Transgenese vielfach beobachtet worden (z.B. Mori et al. 2007, Bubner et al. 2006, Goldman et al. 2004, Ellul et al. 2003, Heeres et al. 2002, Labra et al. 2004, Sala et al. 2000, Arencibia et al. 1999, Bregitzer et al. 1998, Veilleux & Johnson 1998). Zu den möglichen Veränderungen, die in aus In-vitro-Kulturen regenerierten Pflanzen beobachtet werden können, gehören Basensubstitutionen, Änderungen in der Chromosomenzahl und -struktur, Indels und die Aktivierung von transponierbaren Elementen (Neelakandan & Wang 2012, Jiang et al. 2011, Jain 2001). Das Ausmass der Veränderungen kann von einer Reihe von Faktoren abhängen wie beispielsweise dem Genotypen, dem In-vitro-System, der Genomgrösse, dem Alter der Kultur und den Wachstumshormonen im Nährmedium (Bairu et al. 2011).

Integration von T-DNA-Grenzsequenzen: Werden Cisgene mit Hilfe von Agrobakterien in das Erbgut von Pflanzen eingeführt, erfolgt die Insertion via die T-DNA (Transfer DNA). Diese T-DNA wiederum ist an ihren beiden Enden von den so genannten linken (LG) und rechten (RG) Grenzsequenzen flankiert, die für die Insertion des Cisgens erforderlich sind. LG und RG sind maximal 25 Basenpaare lang (Gelvin 2003). Der T-DNA-Strang, der ins Erbgut der Pflanze inseriert wird, enthält normalerweise 21-22 Nukleotide der LG und 3 bis 4 Nukleotide der RG (EFSA 2012a, Schaart & Visser 2009, Conner et al. 2007), wobei es während der Insertion auch zu zufälligen Deletionen von Nukleotiden der LG und RG kommen kann. So kann die RG im Insert oft gänzlich fehlen und die inserierte LG auf zwei Nukleotide verkürzt sein (Prins & Kok 2010).

Integration von Vektor-Rückgrat-Sequenzen: Werden für die Transformation von Cisgenen Plasmide als Vektoren eingesetzt, so können Sequenzen des Vektor-Rückgrats ins Erbgut der Pflanze integriert werden (Gelvin 2003, Kohli et al. 2003, Smith et al. 2001). Die Insertion von Vektor-Rückgrat-Sequenzen wird insbesondere beim Gentransfer mit Hilfe von Agrobakterien oft beobachtet (Kohli et al. 2010, Gelvin 2003), kann aber auch bei der Biolistik vorkommen (Kohli et al. 2003, Smith et al. 2001). Beim Gentransfer mit Hilfe von Agrobakterien können die Vektor-Rückgrat-Sequenzen sowohl verknüpft mit der T-DNA als auch unverknüpft, das heisst unabhängig von der T-DNA, inserieren (Kohli et al. 2010, Permyakova et al. 2009). Zu den Kulturpflanzenarten, bei den die Insertion von Vektor-Rückgrat-Sequenzen beobachtet worden ist, gehören unter anderem Baumwolle (Zhang et al. 2008), Erdbeere (Abdal-Aziz et al. 2006), Gerste (Holme et al. 2012, Lange et al. 2006), Kartoffel (Cullen et al. 2011, Petti et al. 2009), Reis (Kim et al. 2003), Soja (Olhoft et al. 2004), Tabak (Kononov et al. 1997), Weinrebe (Gambino et al. 2009) und Weizen (Wu et al. 2006).

Integration von chromosomalen Sequenzen der Agrobakterien: Werden Cisgene mit Hilfe von Agrobakterien eingeführt, ist es nicht auszuschliessen, dass zusammen mit der T-DNA auch Sequenzen aus dem bakteriellen Chromosom in das Erbgut der transformierten Pflanze inseriert werden (Zhao et al. 2009, Gelvin 2008, Ülker et al. 2008). Ob solche chromosomale Sequenzen

auch unabhängig von der T-DNA ins Erbgut der transformierten Pflanze inserieren können, ist nicht bekannt.

Positions- und Insertionseffekte: Der Ort der Insertion des Cisgens kann den Phänotyp einer cisgenen Pflanze via Insertionseffekte und/oder via Positionseffekte beeinflussen (Filipecki & Malepszy 2006). Insertionseffekte können einerseits aus den bereits oben beschriebenen Insertionsmutationen entstehen und beispielsweise im Gewinn oder Verlust von Funktionen resultieren (Filipecki & Malepszy 2006). Andererseits können Insertionseffekte auftreten, wenn die inserierte DNA die Expression von endogenen Genen beeinflusst (Schaart & Visser 2009, Filipecki & Malepszy 2006, Latham et al. 2006). Dies ist beispielsweise möglich, wenn kodierende Sequenzen, die in der Umgebung des Insertionsortes liegen, unter den Einfluss des Promotors des Cisgens fallen (Filipecki & Malepszy 2006). Positionseffekte wiederum können die Expression des Cisgens beeinflussen (Schaart & Visser 2009).

Effekte der Promotorsequenz: Auch wenn das Konzept der Cisgenese vorsieht, dass nur native Promotoren eingesetzt werden, ist die Promotorsequenz eines Cisgens nicht unbedingt vorgegeben. Der Grund liegt darin, dass Promotoren schwer zu charakterisieren sind und ihre Länge nicht gut definiert ist (Schaart & Visser 2009). Wird bei der Cisgenese ein Promotorsequenz ausgewählt, die nicht ausreichend lang ist, kann dies zu einem unbeabsichtigten Expressionsniveau des Cisgens führen (Schaart & Visser 2009, Szanowski et al. 2009).

Bildung neuer offener Leserahmen: Durch die Insertion der extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen kann es bei der Cisgenese unbeabsichtigt zur Bildung neuer offener Leserahmen kommen. Insetrierte Sequenzen können Teil eines existierenden offenen Leserahmens werden und somit zur Bildung chimärischer Transkripte führen (Schaart & Visser 2009). Offene Leserahmen können auch durch die Insertion von T-DNA-Grenzsequenzen entstehen (Prins & Kok 2010). Denkbar ist des Weiteren, dass während des Insertionsprozesses die Terminator-Sequenz des Cisgens verloren gehen könnte, wodurch ein verlängerter offener Leserahmen entsteht und *read-through* Transkripte resultieren (Rosati et al. 2008).

Änderungen in der Methylierung endogener Sequenzen: Beinhaltet die für die Herstellung einer cisgenen Pflanze eingesetzte Transformationstechnik einen In-vitro-Selektions- und Regenerationsschritt, so kann es im Erbgut der transformierten Pflanze zu Änderungen in der Methylierung endogener Sequenzen kommen (Miguel & Marum 2011). Wird dabei das Methylierungsmuster von regulatorischen Regionen verändert, kann dies die Expression endogener Gene beeinflussen.

Pleiotrope Effekte: Das Produkt eines neu inserierten Cisgens kann einen pleiotropen Effekt haben und unbeabsichtigt Merkmale der Empfängerpflanze beeinflussen, die in keiner Beziehung zur beabsichtigten Wirkung stehen.

### **3.7.6 Sicherheitsaspekte**

Die Sicherheit der Cisgenese beziehungsweise von cisgenen Sorten ist ein Thema, das in der Literatur breit diskutiert wird (EFSA 2012a, Durham et al. 2011, Prins & Kok 2010, Viswanath & Strauss 2010, Jacobsen & Schouten 2009/2008/2007, Schaart & Visser 2009, Jacobsen & Karaba 2008, COGEM 2009b/2006b, Russel & Sparrow 2008, De Cock Buning et al. 2006, Giddings 2006, Myskja 2006, Schouten et al. 2006a/b/c, Schubert & Williams 2006, Krens 2005).

Im Folgenden werden Aspekte aufgeführt, die bei der Bewertung der Sicherheit von cisgenen Pflanzen eine Rolle spielen könnten und zwar für den Fall, dass die Cisgene via etablierten Transformationsmethoden eingeführt werden. Falls für die Cisgenese NRE-Techniken eingesetzt werden, könnte die Darstellung der Sicherheitsaspekte anders ausfallen.



Es wird kein Anspruch darauf erhoben, alle möglichen und denkbaren sicherheitsrelevanten Aspekte zu behandeln.

Quelle des Cisgens/Sicherheit des Genproduktes: Hinsichtlich der Bewertung der Sicherheit des Proteins, das vom einem Cisgen kodiert wird, lassen sich zwei Fälle unterscheiden: (I) Das Cisgen stammt aus einer Pflanze, die bereits Teil der menschlichen und tierischen Ernährung ist und/oder bereits Teil des Agrarökosystems ist, in welchem die cisgene Sorte angebaut werden soll; (II) Das Cisgen stammt aus einer Pflanze, die bisher nicht Teil der menschlichen und tierischen Ernährung ist und/oder bisher nicht Teil des Agrarökosystems ist, in welchem die cisgene Sorte angebaut werden soll. Während im ersten Fall Erfahrungen zur Sicherheit des neu gebildeten Proteins bestehen, fehlen diese Erfahrungen im zweiten Fall (siehe dazu EFSA 2012a, Prins & Kok 2010). Haben Expressionsprodukte von Cisgenen keine *history of safe use* dürften sie anders zu bewerten sein als Expressionsprodukte, die eine lange Historie in Bezug auf die sichere Verwendung haben. Das gleiche gilt auch bei der herkömmlichen Introgressionszüchtung, bei der neue Gene aus Wildpflanzen in Kulturarten eingekreuzt werden (Lusser et al. 2011).

Bildung neuer unbeabsichtigter Proteine: Entstehen durch die Insertion der eingeführten DNA-Sequenzen im Erbgut der Pflanze neue offene Leserahmen, so kann dies zur Bildung neuer unbeabsichtigter Proteine führen. Die Wirkung dieser Proteine kann neutral, erwünscht oder unerwünscht sein. Ob Pflanzen, die unbeabsichtigt neue Proteine bilden, während des Züchtungsprozesses weiterverwendet beziehungsweise aussortiert werden, hängt unter anderem von der Auswahl der Primärtransformanten, der Wirkung der Proteine und der Wahl der Selektionsmethoden ab. Neue offene Leserahmen und neue Proteine können auch spontan durch transposable genetische Elemente entstehen (z.B. Barbaglia et al. 2012, Elrouby & Bureau 2010, Zabala & Vodkin 2007, Wang et al. 2006a, Jiang et al. 2004) und bei der klassischen Mutagenese erzeugt werden (z.B. indem ein Stop-Codon in ein kodierendes Codon mutiert wird).

Gewinn/Verlust endogener Funktionen: Gewinn oder Verlust endogener Funktionen können durch Insertionsmutationen entstehen. Sie können ohne Wirkung bleiben, unerwünschte Wirkungen verursachen oder erwünschte Auswirkungen haben. Inwiefern Pflanzen mit unerwünschtem Gewinn oder Verlust von endogenen Funktionen während des Züchtungsprozesses weiterverwendet beziehungsweise aussortiert werden, hängt unter anderem von der Auswahl der Primärtransformanten, der Manifestation des Gewinns/des Verlusts und der Wahl der Selektionsmethoden ab. Insertionsmutationen kommen auch bei der Translokationszüchtung vor (Jacobsen & Schouten 2008) und können durch Transposons ausgelöst werden – sei es spontan oder in Züchtungsverfahren wie der somaklonalen Selektion, die Transposons aktivieren kann (Gao et al. 2009, Hirochika et al. 1996)

Expressionsniveau des Cisgens: Das Expressionsniveau eines Cisgens wird durch die Anzahl der inserierten Cisgenkopien, durch Positionseffekte und die Wahl der Promotorsequenz beeinflusst. Da das Niveau der Expression weder vorhersehbar noch exakt steuerbar ist, kann es nicht nur unbeabsichtigt hoch oder tief sein, sondern es könnte auch ausserhalb der Bandbreite zu liegen kommen, die innerhalb der Art oder bei Artverwandten natürlicherweise gefunden wird (Prins & Kok 2010). Ob das Expressionsniveau sicherheitsrelevant werden kann oder nicht, hängt von der jeweils ins Erbgut eingefügten codierenden Sequenz des Cisgens ab sowie davon, ob das erzielte Niveau beabsichtigt oder unbeabsichtigt ist. Transformierte Pflanzen, die ein unbeabsichtigt hohes oder tiefes Expressionsniveau aufweisen, können während des Züchtungsprozesses aussortiert werden.

Veränderter Gehalt endogener Proteine und/oder endogener Metabolite: Die Integration des Cisgens kann via Insertionseffekte die Expression endogener Gene beeinflussen, was wiederum dazu führen kann, dass es in einer cisgenen Pflanze zu einer erhöhten Produktion bestimmter endoge-

ner Proteine und/oder Metabolite kommt. Der erhöhte Gehalt an endogenen Proteinen und/oder Metaboliten kann ohne Auswirkungen bleiben, unerwünschte Wirkungen zeigen oder erwünschte Folgen haben. Änderungen in der Expression endogener Gene können auch durch Umwelteinflüsse ausgelöst werden (z.B. Dong et al. 2012, Fernandez et al. 2008, Joosen et al. 2006, Gulick et al. 2005) und bei herkömmlichen Züchtungsverfahren vorkommen (z.B. Swanson-Wagner et al. 2009/2006, Zhuang & Adams 2007, Wang et al. 2006b). Wie verschiedenen Untersuchungen zeigen, können sich die Expressionsprofile herkömmlich gezüchteter Sorten der gleichen Pflanzenart stärker unterscheiden als die Expressionsprofile einer Transformanten und ihrer Ausgangspflanze (Ricroch et al. 2011).

Somaklonale Variationen: Somaklonale Variationen können effektlos bleiben und erwünschte Auswirkungen haben. Sie können aber auch unerwünschte Wirkungen verursachen und deshalb sicherheitsrelevant sein. Inwieweit Pflanzen mit somaklonalen Variationen während des Züchtungsprozesses aussortiert beziehungsweise weiterverwendet werden, hängt unter anderem ab von der Manifestation der somaklonalen Variationen und der Wahl der Selektionsmethoden. Somaklonale Variationen können auch bei anderen Züchtungsverfahren auftreten, wie beispielsweise der In-vitro-Mutagenese. Zudem werden sie beim Zuchtverfahren der somaklonalen Selektion gezielt zur Herstellung neuer Sorten verwendet (Singh & Shetty 2011, Veilleux & Johnson 1998).

Pleiotrope Effekte: Ein pleiotroper Effekt kann ohne Auswirkungen bleiben, unerwünschte Wirkungen zeigen oder erwünschte Folgen haben kann. Ob Pflanzen mit unerwünschtem pleiotropen Effekt während des Züchtungsprozesses aussortiert oder weiterverwendet werden, hängt unter anderem von der Manifestation der Effekte und der Wahl der Selektionsmethoden ab. Pleiotrope Effekte treten auch bei herkömmlichen Kreuzungszüchtungsverfahren und der Transgenese auf (z.B. Ravel et al. 2009, Uauy et al. 2006, Ge et al. 2004, Gutierrez-Campos et al. 2001, Thompson et al. 1999).

### **3.7.7 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden<sup>12</sup>**

Erkennung: Falls die Sequenz und der Insertionsort des Cisgens bekannt sind, können cisgene Pflanzen mit PCR-Methoden erkannt werden. So ist es möglich, Event-spezifische PCR-Primer herzustellen und damit eine Erkennungsmethode zu entwickeln (Lusser et al. 2011).

Identifikation: Falls die Sequenz und der Insertionsort des Cisgens bekannt sind, können cisgene Pflanzen mit PCR-Methoden identifiziert werden. So ist es möglich, Event-spezifische PCR-Primer herzustellen und damit eine Identifikationsmethode zu entwickeln (Lusser et al. 2011).

### **3.7.8 Aspekte der GVO-Klassierung**

Im Folgenden werden Aspekte diskutiert, die bei der GVO-Klassierung von cisgenen Sorten eine Rolle spielen könnten und zwar für den Fall, dass cisgene Sorten frei von artfremden Sequenzen sind. Nicht behandelt wird die Frage, ob die im Abschnitt 3.7.1.1 beschriebene «graue Zone» (Prins & Kok 2010), die bei der Definition der Cisgenese besteht, die unten geführte Diskussion beeinflussen könnte.

Die Diskussion von Aspekten der GVO-Klassierung erfolgt im Lichte von Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV und Anhang 1 Abs. 3 FrSV.

Eine Diskussion der GVO-Klassierung cisgener Sorten im Lichte der EU-Richtlinie 2001/18/EG findet sich in NTWG (2011) und ZKBS (2012).

---

<sup>12</sup> Mit Erkennung ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte festzustellen und zwar in Bezug auf eine geeignete Vergleichssorte. Mit Identifikation wiederum ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte als Veränderung zu erkennen, die absichtlich durch ein bestimmtes Verfahren eingeführt worden ist.

### 3.7.8.1 Cisgene Pflanzen im Lichte von Art. 3. Abs. 1 Bst. d FrSV

Die Cisgenese kann unter einer Prozess-bezogenen wie auch unter einer Produkte-bezogenen Sichtweise betrachtet werden. Unter eine Prozess-bezogenen Sichtweise lässt sich argumentieren, dass die Cisgenese auf Verfahren beruht, die gemäss FrSV als gentechnische Verfahren gelten, weshalb die resultierenden Sorten als GVO zu klassieren sind. Gentechnische Verfahren führen in diesem Sinne immer zu GVO, also auch dann wenn arteigene Gene, Promotoren und Terminatoren verwendet werden. Unter einer Produkt-bezogenen Sichtweise wiederum lässt sich argumentieren, dass cisgene Pflanzen keine GVO sein müssen, da sie – zumindest theoretisch – auch durch Kreuzung erzeugt werden könnten. In dieser Sichtweise führt die Anwendung gentechnischer Verfahren nicht zwingend zu GVO. Als Gegenargument kann hier eingewendet werden, dass es aufgrund der zufälligen Insertion eines Cisgens kaum möglich sein dürfte, mittels Kreuzung genau dieselben Genotypen herzustellen wie bei der Cisgenese. Gegen dieses Gegenargument liesse sich wiederum einwenden, dass sich auch unter natürlichen Bedingungen der «Standort» von Genen im Erbgut auf zufällige Weise ändern kann (z.B. Lai et al. 2005, Lal & Hannah 2005).

Die Sichtweise, dass gentechnische Verfahren nicht zwingend zu GVO führen müssen, könnte durch den erläuternden Bericht zur FrSV (EDI 1997) gestützt werden, heisst es doch dort, dass gentechnische Verfahren solche Verfahren sind, die *in der Regel* zu GVO führen.

### 3.7.8.2 Anhang 1 Abs. 3 FrSV

Gemäss FrSV gilt die Selbstklonierung nicht-pathogener Organismen nicht als gentechnisches Verfahren. Da Pflanzen keine Pathogene sind und die Cisgenese den Kriterien der Selbstklonierung entsprechen kann, lässt sich argumentieren, dass die Cisgenese nicht zwingend ein gentechnisches Verfahren sein muss und cisgene Pflanzen somit unter Umständen nicht als GVO zu klassieren sein könnten (siehe dazu ZKBS 2012, NTWG 2011).

## 3.8 Intragenese

Die Intragenese ist ein neues Konzept zur Transformation von Pflanzen. Im Gegensatz zur Transgenese, bei der Gene zwischen x-beliebigen Arten ausgetauscht werden, beinhaltet das Konzept der Intragenese, dass Pflanzen nur mit arteigenen Genen oder mit Genen von nah verwandten, sexuell kompatiblen Arten transformiert werden (Tabelle 3). Anders als bei der Cisgenese (Abschnitt 3.7) ist es bei der Intragenese möglich, das genetische Material vor der Transformation neu zu kombinieren (Lusser et al. 2012/2011, Molesini et al. 2012, Rommens et al. 2011/2007, Rommens 2010/2007, Schaart & Visser 2009). Zudem besteht bei der Intragenese der Transformationsvektor aus funktionalen DNA-Fragmenten, die aus dem Erbgut der zu verändernden Art oder einer kreuzungskompatiblen Art stammen (Konzept des intragenen Vektors; Molesini et al. 2012, Rommens et al. 2011/2005, Conner et al. 2007, Rommens 2004).

### 3.8.1 Beschreibung des Verfahrens

Bei der Intragenese wird das Erbgut von Pflanzen mit einem oder mehreren Intragenen transformiert. Intragene sind neu kombinierte genetische Konstrukte, deren DNA-Sequenzen entweder von derselben Pflanzenart oder von einer verwandten, kreuzungskompatiblen Art stammen. Mögliche Neukombinationen sind unter anderem die Entfernung der Introns, der Austausch von Promotoren und Terminatoren, der Wechsel der Orientierung der kodierenden Sequenzen sowie die Verwendung von Haarnadel-Konstrukten (Molesini et al. 2012).

Introgene werden mit den gleichen Transformationsmethoden in das Erbgut einer Pflanze eingefügt, die bei der Herstellung transgener Pflanzen üblicherweise verwendet werden, beispielsweise mit biolistischen Verfahren oder mit Hilfe von Agrobakterien. Neben den etablierten Transformationsmethoden können auch die NRE-Techniken für die Intragenese benutzt werden (siehe Abschnitte 3.10, 3.11.1 und 3.11.2).

**Tabelle 3: Transgenese und Intragenese – zwei unterschiedliche Strategien zur Transformation von Pflanzen** (nach Molesini et al. 2012, Rommens et al. 2011).

	<b>Transgenese</b>	<b>Intragenese</b>
Quelle der kodierenden DNA-Sequenzen	Alle Arten	Dieselbe Art oder kreuzungs-kompatible Art
Quelle der regulatorischen DNA-Sequenzen	Alle Arten	Dieselbe Art oder kreuzungs-kompatible Art
Typ des genetischen Konstruktes	Neue Kombinationen von kodierenden und regulatorischen Sequenzen	Neue Kombinationen von kodierenden und regulatorischen Sequenzen
Orientierung der exprimierten Sequenz	<i>Sense</i> - oder <i>antisense</i> -Orientierung, Haarnadel-Konstrukte	<i>Sense</i> - oder <i>antisense</i> -Orientierung, Haarnadel-Konstrukte
T-DNA Grenzsequenzen	Linke und rechte Grenzsequenzen der <i>Agrobacterium</i> T-DNA	Linke und rechte Ränder der Transfer-DNA stammen von der Pflanze selbst oder von einer kreuzungskompatibler Art*
Selektierbare Markergene	Markergene vorhanden	Entweder keine Markergene vorhanden oder pflanzliche Markergene vorhanden

\*: siehe Konzept der P-DNA in Abschnitt 3.8.1.1

Da intragene Pflanzen per Definition keine artfremden Sequenzen enthalten sollen, muss ihre Herstellung so erfolgen, dass sie entweder einen intragenen Marker besitzen (Rosellini 2011) oder frei von Markergenen sind. Für die Herstellung Marker-freier intragener Pflanzen stehen unterschiedliche Strategien zur Verfügung. Einerseits ist es möglich, Pflanzen direkt ohne Markergen zu transformieren (siehe Beispiele in Tuteja et al. 2012 und Manimaran et al. 2011). Andererseits gibt es verschiedene Verfahren, Markergene aus transformierten Pflanzen zu entfernen (Übersichten in Tuteja et al. 2012, Manimaran et al. 2011, Upadhyaya et al. 2010, Darbani et al. 2007).

Mit den gängigen Transformationsmethoden können zusammen mit den Intragenen auch noch weitere Sequenzen ins Erbgut einer Pflanze inseriert werden. Zu diesen Sequenzen gehören unter anderem Grenzsequenzen der T-DNA und Vektor-Rückgrat-Sequenzen. Um zu vermeiden, dass damit artfremde Sequenzen ins Erbgut einer intragenen Pflanze gelangen, haben Forschende das Konzept der P-DNA beziehungsweise das Konzept des intragenen Vektors entwickelt (Rommens 2004, Rommens et al. 2004).

### 3.8.1.1 P-DNA-Konzept

Werden Intragene mit Hilfe von Agrobakterien in Pflanzenzellen eingeführt, erfolgt die Insertion via die T-DNA (Transfer DNA). Diese T-DNA ist an ihren beiden Enden von den so genannten linken (LG) und rechten (RG) Grenzsequenzen flankiert, die für die Insertion des Intragens erforderlich sind. LG und RG sind maximal 25 Basenpaare lang (Gelvin 2003). Der T-DNA-Strang, der ins Erbgut der Pflanze inseriert wird, enthält normalerweise 21-22 Nukleotide der LG und 3 bis 4 Nukleotide der RG (EFSA 2012a, Schaart & Visser 2009, Conner et al. 2007), wobei es während der Insertion auch zu zufälligen Deletionen von Nukleotiden der LG und RG kommen kann. So kann die RG im Insert oft gänzlich fehlen und die inserierte LG auf zwei Nukleotide verkürzt sein (Prins & Kok 2010). Falls Sequenzen des LG und/oder RG zusammen mit dem Intragen ins Erbgut einer Pflanze inseriert werden, besäße die Pflanze artfremde Sequenzen, weshalb sie nicht mehr unter die Definition der Intragenese fallen würde. Um dies zu verhindern, wird bei der Transformation anstelle der T-DNA P-DNA verwendet. P-DNA ist funktionell identisch mit der T-DNA. Ihre LG und RG bestehen jedoch aus Sequenzen, die von der zu transformierenden Pflanze selbst oder einer kreuzbaren Art stammen. Zur Herstellung von P-DNA werden hauptsächlich zwei Ansätze verfolgt. (I) Der erste Ansatz besteht darin, im Erbgut einer Pflanze Sequenzbereiche zu suchen, die soweit homolog mit den LG und RG der T-DNA von Agrobakterien sind, dass sie deren Funktion übernehmen können. Werden solche Sequenzen gefunden, können sie in der P-DNA als LG und RG eingesetzt werden (Rommens et al. 2005/2004). (II) Der zweite Ansatz besteht darin, im Erbgut einer Pflanze nach Sequenzbereichen zu suchen, die funktional die LG und RG der T-DNA ergeben, wenn sie zusammengesetzt werden (Conner et al. 2007). Die P-DNA wird somit *in silicio* aus pflanzeigenen Sequenzen konstruiert. Im Falle des RG ist es des Weiteren möglich einen dritten Ansatz zu verfolgen: Da normalerweise nur die ersten 3 bis 4 Nukleotide des RG ins Erbgut der Pflanze inseriert werden, lassen sich chimärische P-DNAs herstellen, bei denen die ersten vier Nukleotide des RG pflanzlichen Ursprungs sind und der Rest identisch mit der authentischen Agrobakterien RG ist (Conner et al. 2007).

### 3.8.1.2 Konzept des intragenen Vektors

Da bei der Transformation von Intragenen neben den LG und RG der T-DNA noch weitere Sequenzen aus dem Vektor ins Erbgut der Pflanze mit inseriert werden können, werden intragene Vektoren konstruiert, um die Insertion artfremder Sequenzen zu minimieren (Rommens et al. 2011, Conner et al. 2007). Das Konzept des intragenen Vektors besteht dabei darin, im Erbgut einer zu transformierenden Pflanze (oder einer sexuell kompatiblen Artverwandten) Sequenzen zu identifizieren, die funktional identisch sind mit Vektorsequenzen. Werden solche Sequenzen gefunden, können sie zur Konstruktion eines Vektors genutzt werden (Conner et al. 2007).

### 3.8.1.3 Definitorische Aspekte

Die Intragenese ist ein Konzept, das in der Literatur unterschiedlich definiert wird. Zu den Aspekten, in den jeweiligen Definition verschieden oder nicht behandelt werden, gehören folgende:

**Kodonveränderungen:** Ein Intragen lässt sich synthetisch herstellen, weshalb es möglich ist, seine Sequenz an die Kodonvorlieben der zu transformierenden Pflanze anzupassen. Inwiefern synthetische Gene mit optimierten Kodons unter die Definition der Intragenese fallen oder nicht, ist unklar.

**Quelle des eingefügten genetischen Materials:** Was die Quelle der Intragene betrifft, werden bei den unterschiedlichen Definitionen der Intragenese verschiedene Begriffe verwendet: Die Sequenzen der intragenen Konstrukte können aus dem «natürlichen Genpool» einer Pflanze stammen

oder aus dem «Genpool der Züchter» (*breeder's gene pool*) oder von «kreuzbaren Arten» oder von «sexuell kompatiblen Arten». Zu klären sein könnten dabei folgende Fragen: Können Gene, die sich allein via eine Brückenkreuzung in eine Pflanze einkreuzen lassen, als Intragene eingesetzt werden? Können Gene, die sich allein via Weite Kreuzungen und *embryo-rescue*-Verfahren in eine Pflanze übertragen lassen, als Intragene verwendet werden? Hängt die Antwort auf die beiden Fragen davon ab, ob die Gene bereits via Brückenkreuzung oder Weite Kreuzung übertragen worden sind und somit im Erbgut einer «direkt» kreuzbaren Art vorliegen?

### **3.8.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht**

Die Intragenese kann in der Pflanzenzüchtung eingesetzt werden, um bestehende Sorten genetisch zu verbessern. Da sich das benutzte genetische Material vor der Transformation neu kombinieren lässt, bietet das Verfahren unterschiedlichste Möglichkeiten. So ermöglicht die Intragenese nicht nur die Expression neuer Gene, sondern auch die Stilllegung, die Überexpression oder die Änderung der Gewebeaktivität von endogenen Genen. Zu den Eigenschaften, die mittels Intragenese erzeugt werden könnten, gehören unter anderem: verbesserte Krankheitsresistenz, reduzierter Allergengehalt, veränderte Stärkezusammensetzung, erhöhte Vitaminmenge und verringerter Ligningehalt (siehe Rommens 2007).

### **3.8.3 Stand der Entwicklung**

Das Konzept der Intragenese ist 2004 erstmals formuliert worden (Rommens 2004, Rommens et al. 2004). Seither sind für verschiedene Kulturarten P-DNAs entwickelt und vereinzelt intragene Pflanzen hergestellt worden (Conner et al. 2007, Rommens et al. 2005). Gemäss Rommens et al. (2011) wird die Entwicklung intragener Pflanzen bei folgenden Kulturarten verfolgt: Apfel, Kartoffel, Klee, Luzerne, Petunie, Pfeffer, Raps, Raygras, Reis, Süsskartoffel und Tomate.

In der EU werden in zwei Freisetzungsvorsuchen Pflanzen getestet, die je nach Definition als intragene Pflanzen bezeichnet werden können: Schorf-resistente Äpfel und Amylose-freie Kartoffeln (JRC 2012, Lusser et al. 2011).

In den USA ist beim Landwirtschaftsministerium ein Antrag für den kommerziellen Anbau von intragenen Kartoffeln hängig, bei deren Verarbeitung zu Pommes und Chips weniger Acrylamid entstehen soll (USDA 2012). Die intragene Kartoffel wird in der Literatur von Rommens et al. (2008/2006) beschrieben.

### **3.8.4 Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen**

Die beabsichtigte genetische Veränderung besteht darin, ein oder mehrere Intragene in das Erbgut einer Pflanze zu inserieren. Die beabsichtigte Wirkung wird durch das inserierte Intragen/die inserierten Intragene bestimmt.

### **3.8.5 Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen**

Zu den möglichen unbeabsichtigten Veränderungen und Wirkungen der Intragenese gehören:

*Insertionsmutationen:* Mit den etablierten Transformationsmethoden ist es nicht möglich, Intragene an einen vorbestimmten Ort im Genom zu inserieren (Somers & Makarevitsch 2004). Da die Insertion damit weitgehend zufällig erfolgt, können Intragene unabsichtlich in Sequenzbereiche von aktiven Genen, Promotoren oder anderen funktionalen Elementen integrieren und somit Insertionsmutationen erzeugen (Prins & Kok 2010, Schaart & Visser 2009, Filipecki & Malepszy 2006, Latham et al. 2006) Die Erzeugung mehrerer solcher Mutationen kann dann erfolgen, wenn bei der Transformation gleichzeitig mehrere Intragene oder Bruchstücke davon an unabhängigen Orten im Erbgut inseriert werden (siehe dazu Filipecki & Malepszy 2006, Latham et al. 2006,

Cellini et al. 2004). Insertionsmutationen könnten des Weiteren entstehen, weil der Prozess der Transformation transponierbare Elemente aktivieren kann (Wu et al. 2009, Bhatt et al. 1998).

Somaklonale Variationen: Beinhaltet die für die Herstellung einer intragenenen Pflanze eingesetzte Transformationstechnik einen In-vitro-Selektions- und Regenerationsschritt, so kann es im Erbgut der transformierten Pflanze zu somaklonalen Variationen kommen. Somaklonale Variationen umfassen sowohl genetische wie auch epigenetische Veränderungen im Erbgut, können bei allen aus In-vitro-Kulturen regenerierten Pflanzen auftreten (Bairu et al. 2011) und sind bei der Transgenese vielfach beobachtet worden (z.B. Mori et al. 2007, Bubner et al. 2006, Goldman et al. 2004, Ellul et al. 2003, Heeres et al. 2002, Labra et al. 2001, Sala et al. 2000, Arencibia et al. 1999, Bregitzer et al. 1998, Veilleux & Johnson 1998). Zu den möglichen genetischen Veränderungen, die in aus In-vitro-Kulturen regenerierten Pflanzen beobachtet werden können, gehören Änderungen in der Chromosomenzahl und -struktur, Basensubstitutionen, Indels und die Aktivierung von transponierbaren Elementen (Neelakandan & Wang 2012, Jiang et al. 2011, Miguel & Marum 2011, Jain 2001). Das Ausmass der Veränderungen kann von einer Reihe von Faktoren abhängen wie beispielsweise dem Genotypen, dem In-vitro-System, der Genomgrösse, dem Alter der Kultur und den Wachstumshormonen im Nährmedium (Bairu et al. 2011).

Integration von P-DNA-Grenzsequenzen: Werden Intragene mit Hilfe von Agrobakterien in das Erbgut von Pflanzen eingeführt, erfolgt die Insertion via die P-DNA (Abschnitt 3.8.1.1). Diese P-DNA wiederum ist an ihren beiden Enden von den so genannten linken (LG) und rechten (RG) Grenzsequenzen flankiert, die für die Insertion des Intragens erforderlich sind. Teile dieser LG und RG können zusammen mit dem Intragen ins Erbgut der Pflanze integriert werden.

Integration von Vektor-Rückgrat-Sequenzen: Werden für die Transformation von Intragenen Plasmide als Vektoren eingesetzt, so können Sequenzen des Vektor-Rückgrats ins Erbgut der Pflanze integriert werden (Gelvin 2003, Kohli et al. 2003, Smith et al. 2001). Die Insertion von Vektor-Rückgrat-Sequenzen wird insbesondere beim Gentransfer mit Hilfe von Agrobakterien oft beobachtet (Kohli et al. 2010, Gelvin 2003), kann aber auch bei der Biolistik vorkommen (Kohli et al. 2003, Smith et al. 2001). Beim Gentransfer mit Hilfe von Agrobakterien dürften die Vektor-Rückgrat-Sequenzen sowohl verknüpft mit der P-DNA als auch unverknüpft, das heisst unabhängig von der P-DNA, inserieren (Kohli et al. 2010, Permyakova et al. 2009). Zu den Kulturpflanzenarten, bei den die Insertion von Vektor-Rückgrat-Sequenzen beobachtet worden ist, gehören unter anderem Baumwolle (Zhang et al. 2008), Erdbeere (Abdal-Aziz et al. 2006), Gerste (Holme et al. 2012, Lange et al. 2006), Kartoffel (Cullen et al. 2011, Petti et al. 2009), Reis (Kim et al. 2003), Soja (Olhoft et al. 2004), Tabak (Kononov et al. 1997), Weinrebe (Gambino et al. 2009) und Weizen (Wu et al. 2006).

Integration von chromosomalen Sequenzen der Agrobakterien: Werden Intragene mit Hilfe von Agrobakterien eingeführt, ist es nicht auszuschliessen, dass zusammen mit der P-DNA auch Sequenzen aus dem bakteriellen Chromosom in das Erbgut der transformierten Pflanze inseriert werden (Zhao et al. 2009, Gelvin 2008, Ülker et al. 2008). Ob solche chromosomale Sequenzen auch unabhängig von der P-DNA ins Erbgut der transformierten Pflanze inserieren können, ist nicht bekannt.

Positions- und Insertionseffekte: Der Ort der Insertion des Intragens kann den Phänotyp einer intragenenen Pflanze via Insertionseffekte und/oder via Positionseffekte beeinflussen (Filipecki & Malepszy 2006). Insertionseffekte können einerseits aus Insertionsmutationen entstehen und beispielsweise im Gewinn oder Verlust von Funktionen resultieren (Filipecki & Malepszy 2006). Andererseits können Insertionseffekte auftreten, wenn die inserierte DNA die Expression von endogenen Genen beeinflusst (Schaart & Visser 2009, Filipecki & Malepszy 2006, Latham et al.

2006). Dies ist beispielsweise möglich, wenn kodierende Sequenzen, die in der Umgebung des Insertionsortes liegen, unter den Einfluss des Promotors des Intragens fallen (Filipecki & Malepszy 2006). Positionseffekte wiederum können die Expression des Intragens beeinflussen (Schaart & Visser 2009).

Bildung neuer offener Leserahmen: Durch die Insertion der extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen kann es bei der Intragenese unbeabsichtigt zur Bildung neuer offener Leserahmen kommen. Inserierte Sequenzen können Teil eines existierenden offenen Leserahmens werden und somit zur Bildung chimärischer Transkripte führen (Schaart & Visser 2009). Offene Leserahmen können auch durch die Insertion von P-DNA-Grenzsequenzen entstehen (Prins & Kok 2010). Denkbar ist des Weiteren, dass während des Insertionsprozesses die Terminator-Sequenz des Intragens verloren gehen könnte, wodurch ein verlängerter offener Leserahmen entsteht und *read-through* Transkripte resultieren (Rosati et al. 2008).

Änderungen in der Methylierung endogener Sequenzen: Beinhaltet die für die Herstellung einer intragenen Pflanze eingesetzte Transformationstechnik einen In-vitro-Selektions- und Regenerationsschritt, so kann es im Erbgut der transformierten Pflanze zu Änderungen in der Methylierung endogener Sequenzen kommen (Miguel & Marum 2011). Wird dabei das Methylierungsmuster von regulatorischen Regionen verändert, kann dies die Expression endogener Gene beeinflussen.

Pleiotrope Effekte: Das Produkt des neu inserierten Intragens kann einen pleiotropen Effekt haben und unbeabsichtigt Merkmale der Empfängerpflanze beeinflussen, die in keiner Beziehung zur beabsichtigten Wirkung stehen.

### **3.8.6 Sicherheitsaspekte**

Im Folgenden werden Aspekte aufgeführt, die bei der Bewertung der Sicherheit von intragenen Pflanzen eine Rolle spielen könnten und zwar für den Fall, dass die Intragene via die etablierten Transformationsmethoden eingeführt wird. Falls für die Intragenese NRE-Techniken eingesetzt werden, könnte die Darstellung der Sicherheitsaspekte anders ausfallen.

Es wird kein Anspruch darauf erhoben, alle möglichen und denkbaren sicherheitsrelevanten Aspekte zu behandeln.

Quelle des Intragens/Sicherheit des Genprodukts: Wird die Intragenese dazu benutzt, um eine Sorte herzustellen, die ein neues Protein bildet, lassen sich hinsichtlich der Quelle des Intragens zwei Fälle unterscheiden: (I) Das Intragen stammt aus einer Pflanze, die bereits Teil der menschlichen und tierischen Ernährung ist und/oder bereits Teil des Agrarökosystems ist, in welchem die intragene Sorte angebaut werden soll; (II) Das Intragen stammt aus einer Pflanze, die bisher nicht Teil der menschlichen und tierischen Ernährung ist und/oder bisher nicht Teil des Agrarökosystems ist, in welchem die intragene Sorte angebaut werden soll. Während im ersten Fall Erfahrung zur Sicherheit des neu gebildeten Proteins bestehen, fehlen diese Erfahrungen im zweiten Fall.

Expressionsniveau des Intragens: Das Expressionsniveau von Intragenen wird durch die Anzahl der inserierten Intrakopien, durch Positionseffekte und die Wahl der Promotorsequenz beeinflusst (Schaart & Visser 2009). Da das Niveau der Expression eines Intragens weder vorhersehbar noch exakt steuerbar ist, kann es unbeabsichtigt hoch oder tief sein und auch ausserhalb der Brandbreite zu liegen kommen, die innerhalb der Art oder bei Artverwandten natürlicherweise gefunden wird (Schaart & Visser 2009). Ob das Expressionsniveau eines Intragens sicherheitsrelevant werden kann oder nicht, hängt von der jeweils transformierten codierenden Sequenz ab sowie davon, ob das erzielte Niveau beabsichtigt oder unbeabsichtigt ist. Transformierte Pflanzen,



die ein unbeabsichtigt hohes oder tiefes Expressionsniveau aufweisen, können während des Züchtungsprozesses aussortiert werden.

Expressionsort des Intragens: Da bei der Intragenese kodierende und regulatorische Sequenzen neu kombiniert werden können, ist es möglich das Expressionsmuster der kodierenden Sequenz zu ändern. In Sorten mit verändertem Expressionsmuster kann das Produkt eines Intragens somit in Geweben einer Pflanze vorkommen, in denen es natürlicherweise nicht auftritt. Je nach Expressionsort des Intragens werden neue Expositionssituationen möglich, die unter Umständen sicherheitsrelevant sein können.

Bildung neuer unbeabsichtigter Proteine: Entstehen durch die Insertion der eingeführten DNA-Sequenzen im Erbgut der Pflanze neue offene Leserahmen, so kann dies zur Bildung neuer unbeabsichtigter Proteine führen. Die Wirkung dieser Proteine kann neutral, erwünscht oder unerwünscht sein. Ob Pflanzen, die unbeabsichtigt neue Proteine bilden, während des Züchtungsprozesses weiterverwendet beziehungsweise aussortiert werden, hängt unter anderem von der Auswahl der Primärtransformanten, der Wirkung der Proteine und der Wahl der Selektionsmethoden ab. Neue offene Leserahmen und neue Proteine können auch spontan durch transposable genetische Elemente entstehen (z.B. Elrouby & Bureau 2010, Zabala & Vodkin 2007, Wang et al. 2006a, Jiang et al. 2004) und bei der klassischen Mutagenese erzeugt werden (z.B. indem ein Stop-Codon in ein kodierendes Codon mutiert wird).

Gewinn/Verlust endogener Funktionen: Gewinn oder Verlust endogener Funktionen können durch Insertionsmutationen entstehen. Sie können ohne Wirkung bleiben, unerwünschte Wirkungen verursachen oder erwünschte Auswirkungen haben. Inwiefern Pflanzen mit unerwünschtem Gewinn oder Verlust von endogenen Funktionen während des Züchtungsprozesses weiterverwendet oder aussortiert werden, hängt unter anderem von der Auswahl der Primärtransformanten, der Manifestation des Gewinns/des Verlusts und der Wahl der Selektionsmethoden ab. Insertionsmutationen kommen auch bei der Translokationszüchtung vor (Jacobsen & Schouten 2008) und können durch Transposons ausgelöst werden – sei es spontan oder in Züchtungsverfahren wie der somaklonalen Selektion, die Transposons aktivieren kann (Gao et al. 2009, Hirochika et al. 1996)

Veränderter Gehalt endogener Proteine und/oder endogener Metabolite: Die Integration des Intragens kann via Insertionseffekte die Expression endogener Gene beeinflussen, was wiederum dazu führen kann, dass es in einer intragenen Pflanze zu einer erhöhten Produktion bestimmter endogener Proteine und/oder Metabolite kommt. Der erhöhte Gehalt an endogenen Proteinen und/oder Metaboliten kann ohne Auswirkungen bleiben, unerwünschte Wirkungen zeigen oder erwünschte Folgen haben. Änderungen in der Expression endogener Gene können auch durch Umwelteinflüsse ausgelöst werden (z.B. Dong et al. 2012, Fernandez et al. 2008, Joosen et al. 2006, Gulick et al. 2005) und bei herkömmlichen Züchtungsverfahren vorkommen (z.B. Swanson-Wagner et al. 2009/2006, Zhuang & Adams 2007, Wang et al. 2006b). Wie verschiedenen Untersuchungen zeigen, können sich die Expressionsprofile herkömmlich gezüchteter Sorten der gleichen Pflanzenart stärker unterscheiden als die Expressionsprofile einer Transformanten und ihrer Ausgangspflanze (Ricroch et al. 2011).

Somaklonale Variationen: Somaklonale Variationen können effektiv bleiben und erwünschte Auswirkungen haben. Sie können aber auch unerwünschte Wirkungen verursachen und deshalb sicherheitsrelevant sein. Inwieweit Pflanzen mit somaklonalen Variationen während des Züchtungsprozesses aussortiert beziehungsweise weiterverwendet werden, hängt unter anderem ab von der Manifestation der somaklonalen Variationen sowie der Wahl der Selektionsmethoden. Somaklonale Variationen können auch bei anderen Züchtungsverfahren auftreten, wie beispielsweise der In-vitro-Mutagenese. Zudem werden sie beim Zuchtverfahren der somaklonalen

Selektion gezielt zur Herstellung neuer Sorten verwendet (Singh & Shetty 2011, Veilleux & Johnson 1998).

Pleiotrope Effekte: Ein pleiotroper Effekte kann ohne Auswirkungen bleiben, unerwünschte Wirkungen zeigen oder erwünschte Folgen haben kann. Ob Pflanzen mit unerwünschtem pleiotropen Effekt während des Züchtungsprozesses aussortiert oder weiterverwendet werden, hängt unter anderem von der Manifestation der Effekte und der Wahl der Selektionsmethoden ab. Pleiotrope Effekte treten auch bei herkömmlichen Kreuzungszüchtungsverfahren und der Transgenese auf (z.B. Ravel et al. 2009, Uauy et al. 2006, Ge et al. 2004, Gutierrez-Campos et al. 2001, Thompson et al. 1999).

### **3.8.7 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden<sup>13</sup>**

Erkennung: Falls die Sequenz und der Insertionsort des Intransgens bekannt sind, können intragene Pflanzen mit PCR-Methoden erkannt werden (Lusser et al. 2011).

Identifikation: Falls die Sequenz und der Insertionsort des Intransgens bekannt sind, können intragene Pflanzen mit PCR-Methoden identifiziert werden. So ist es möglich, Event-spezifische PCR-Primer herzustellen und damit eine Identifikationsmethode zu entwickeln (Lusser et al. 2011).

### **3.8.8 Aspekte der GVO-Klassierung**

Die Intransgenese beruht auf Verfahren, die gemäss FrSV als gentechnische Verfahren gelten, und führt zu Sorten, deren genetisches Material so verändert worden ist, wie es durch Kreuzung nicht möglich wäre. Sorten, die aus der Intransgenese hervorgehen, dürften deshalb sowohl aus einer Prozess-bezogenen wie auch aus einer Produkt-bezogenen Sichtweise als GVO zu klassieren sein. Anders als die Cisgenese (siehe Abschnitt 7.7.8.2) dürfte die Intransgenese die Kriterien der Selbstklonierung nicht erfüllen (NTWG 2011).

Eine Diskussion der GVO-Klassierung intragener Sorten im Lichte der EU-Richtlinie 2001/18/EG findet sich in NTWG (2011) und ZKBS (2012).

## **3.9 Pfropfen**

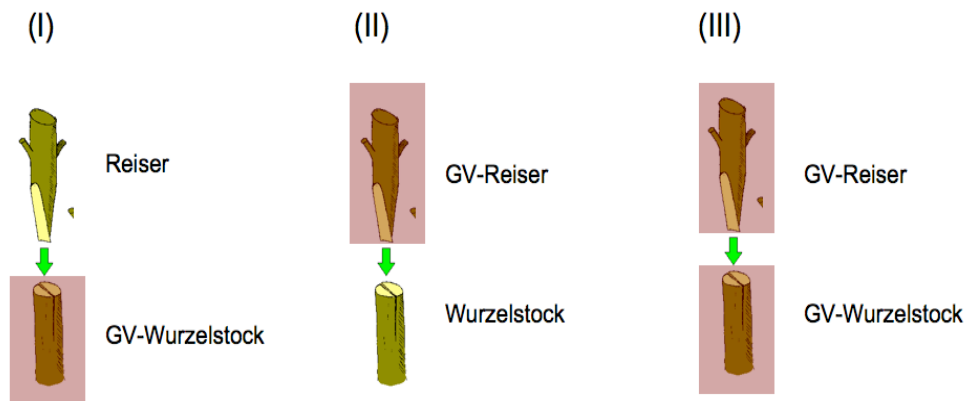
Pfropfen ist ein altes Verfahren und besteht im Wesentlichen darin, dass ein Zweig (Reiser) einer Sorte mit einer Unterlage (Wurzelstock) einer anderen Sorte zusammengefügt wird. Wird die Pfropftechnik mit der Gentechnik kombiniert, lässt sich dies auf drei verschiedene Arten tun (Abbildung 7): (I) Pfropfen eines herkömmlichen Reisers auf einen gentechnisch veränderten Wurzelstock; (II) Pfropfen eines gentechnisch veränderten Reisers auf einen herkömmlichen Wurzelstock, und (III) Pfropfen eines gentechnisch veränderten Reisers auf einen gentechnisch veränderten Wurzelstock.

In den folgenden Abschnitten wird ausschliesslich der Fall (I) behandelt. Er wird in der Pflanzenzucht am häufigsten verfolgt und ist für die vorliegende Arbeit relevant, weil sich aus regulatorischer Sicht die Frage stellt, wie mit den Nachkommen und Produkten des Reisers umzugehen ist. Für den Fall (II) konnte in der Literatur nur ein einzelnes Beispiel gefunden werden (Bai et al. 2011), bei dem sich ebenfalls regulatorische Fragen stellen dürften. Dieses Beispiel betrifft das RdDM-Verfahren (dargestellt in Abschnitt 3.4.1.4) und wird im Folgenden nicht behandelt. Eben-

---

<sup>13</sup> Mit Erkennung ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte festzustellen und zwar in Bezug auf eine geeignete Vergleichssorte. Mit Identifikation wiederum ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte als Veränderung zu erkennen, die absichtlich durch ein bestimmtes Verfahren eingeführt worden ist.

falls nicht behandelt wird der Fall (III), da sowohl die Chimäre wie auch deren Nachkommen und Produkte als GVO zu klassieren sind.



**Abbildung 7:** Die drei möglichen Arten von Chimären, die bei der Kombination von Pfropftechnik und Gentechnik entstehen können; GV = gentechnisch verändert. Bildquelle: Schouten

### 3.9.1 Beschreibung des Verfahrens

Das Verfahren kombiniert die Pfropftechnik mit der Gentechnik. Dabei werden als erstes gentechnisch veränderte Wurzelstöcke hergestellt. Dies geschieht, in dem eine Pflanze mittels klassischen gentechnischen Methoden (z.B. mittels Agrobakterien oder Biolistik) transformiert wird. Aus der transformierten Pflanze werden dann die Wurzelstöcke isoliert beziehungsweise gewonnen. Schliesslich werden auf die gentechnisch veränderten Wurzelstöcke die Reiser gepfropft (Lusser et al. 2011).

Bei der Herstellung der Wurzelstöcke können verschiedene Verfahren wie die Tansgenese, die Cisgenese, die Intragenese oder die RNA-Interferenztechnik eingesetzt werden (Bai et al. 2011, Kasai et al. 2011, Lusser et al. 2011).

### 3.9.2 Anwendungen in der Pflanzenzucht

Das herkömmliche Pfropfen kommt hauptsächlich bei Zier- und Obstbäumen, Gemüse und Blumen zum Einsatz. Bei allen pfpfaren Arten, die mittels gentechnischen Methoden transformierbar sind, lassen sich Chimären aus gentechnisch nicht veränderten Reisern und gentechnisch veränderten Wurzelstöcken herstellen.

Das Pfropfen von herkömmlichen Reisern auf gentechnisch veränderte Wurzelstöcke kann in der Pflanzenzucht hauptsächlich für die drei im Folgenden aufgeführten Zwecke angewandt werden (Lusser et al. 2011, Schaart & Visser 2009):

1. *Einsatz von Wurzelstöcken mit neuen Eigenschaften:* Wurzelstöcke werden so gentechnisch verändert werden, dass sie gegen bodenbürtige Krankheiten resistent sind oder verbesserte Durchwurzelungseigenschaften besitzen (z.B. Geier et al. 2008, Park et al. 2005, Escobar et al. 2002). Beides kann den Ertrag der an den Reisern geernteten Produkte erhöhen.
2. *Veränderung der Eigenschaften des Reisers:* Wurzelstöcke werden so gentechnisch verändert, dass sie Proteine oder siRNAs bilden, die absichtlich in den Reiser transportiert werden und somit die Eigenschaften des Reisers in erwünschter Weise verändern (Kasai et al. 2011, Notaguchi et al. 2008, Dutt et al. 2007). Auf diesem Wege lassen sich neue Eigenschaften in eine Reihe genetisch

unterschiedlicher Reiser einführen, ohne dass diese selbst gentechnisch verändert werden müssen (Lusser et al. 2011).

*3. Hilfsmittel für anderer Züchtungsverfahren:* wie unter 2. werden die Wurzelstöcke so verändert, dass sie Proteine oder siRNAs bilden, die in den Reiser transportiert werden. Das Ziel ist dabei jedoch nicht, im Reiser direkt kommerzielle Eigenschaften zu induzieren, sondern vielmehr die Ermöglichung von Züchtungsverfahren wie zum Beispiel die Beschleunigte Züchtung (Febres et al. 2011, Zhang et al. 2010a; siehe Abschnitt 3.6), das *Reverse Breeding* (Dirks et al. 2009; siehe Abschnitt 3.5) oder das RdDM (Bai et al. 2011; siehe Abschnitt 3.4).

Zusätzlich zu den genannten drei Anwendungszwecken wird neuerdings auch diskutiert, Wurzelstöcke mit transformierten Plastiden in der Pflanzenzüchtung zu verwenden (Thyssen et al. 2012, Stegemann et al. 2012). Da Chloroplasten aus dem Wurzelstock in den Reiser transportiert werden können, wird es möglich, transplastomische Wurzelstöcke zu nutzen, um transformierte Plastide in verschiedene Sorten einzubringen (Thyssen et al. 2012) oder um transplastomische Sorten bei solchen Pflanzenarten zu züchten, deren Plastide sich nicht transformieren lassen (Stegemann et al. 2012). Da diese Anwendungen zu transplastomischen Sorten und damit zu GVO führen, werden sie im Folgenden nicht weiter behandelt.

### **3.9.3 Stand der Entwicklung**

Das Potenzial, gentechnisch veränderten Wurzelstöcken zur Verbesserung der Eigenschaften des Reisers oder zur Ermöglichung anderer Züchtungsverfahren einzusetzen, wird gegenwärtig noch weitgehend an Modellpflanzen untersucht. Kommerzialisierungen dürften bei diesen beiden Anwendungsmöglichkeiten entsprechend erst langfristig zu erwarten sein.

Weit fortgeschrittener ist hingegen die Entwicklung von gentechnisch veränderten Wurzelstöcken, die resistent gegen Krankheiten sind oder verbesserte Durchwurzelungseigenschaften besitzen. Entsprechende Chimären werden bereits im Freiland getestet. In der EU zum Beispiel sind Freisetzungsversuche mit Apfel, Birne, Citrange, Orange und Weinrebe durchgeführt worden (Lusser et al. 2011). Des Weiteren findet sich in der Literatur eine Reihe von Publikationen zu entsprechenden Projekten, hauptsächlich bei Apfel, Wassermelone und Weinrebe (Krastanova et al. 2010, Smolka et al. 2010, Hemmer et al. 2009, Youk et al. 2009, Xu et al. 2009, Geier et al. 2008, Kim et al. 2008, Agüero et al. 2005, Gambino et al. 2005, Park et al. 2005, Vigne et al. 2004, Coutos-Thevenot et al. 2001, Zhu et al. 2001). Neben den genannten Arten existieren/existierten auch Forschungsprojekte bei Gurke, Erbse, Kartoffel, Orange, Pflaume, Rose, Tabak, Tomate und Walnuss (Übersicht bei Lusser et al. 2011).

Gemäss Lusser et al. (2011) könnten Chimären aus herkömmlichen Reisern und gentechnisch veränderten Wurzelstöcken innerhalb der nächsten fünf Jahre auf den Markt kommen.

### **3.9.4 Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen**

Wurzelstock: Die beabsichtigte genetische Veränderung besteht in der Insertion eines neuen genetischen Konstruktes. Das genetische Konstrukt kann beispielsweise ein Transgen, ein Cisgen, ein Intragen oder auch ein RNAi-Konstrukt sein. Die beabsichtigte Wirkung im Wurzelstock wird durch den Promotor und die Gensequenzen des integrierten Konstruktes bestimmt.

Reiser: Der Reiser weist keine beabsichtigten genetischen Veränderungen auf. Inwiefern in den Reisern beabsichtigte Wirkungen vorkommen, hängt von der jeweiligen Anwendung ab (siehe Abschnitt 3.9.2). Falls in den Reisern Wirkungen beabsichtigt sind, werden diese durch das in den Wurzelstock eingefügte Konstrukt bestimmt. Werden keine Produkte, die mit der gentechnischen

Veränderung des Wurzelstocks verbunden sind, in den Reiser transportiert, treten im Reiser weder beabsichtigte noch unbeabsichtigte Wirkungen auf (Schaart & Visser 2009).

### **3.9.5 Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen**

Wurzelstock: Da die Integration des neuen Konstruktes mittels gentechnischer Methoden erfolgt, kann der Wurzelstock auch unbeabsichtigte genetische Veränderungen aufweisen, die mit dem Transformationsprozess einhergehen (siehe dazu Filipecki & Malepszy 2006, Latham et al. 2006). Unbeabsichtigte Wirkungen sind unter anderem möglich durch pleiotrope Effekte der integrierten Konstrukte, durch Positionseffekte sowie durch somaklonale Variation (Filipecki & Malepszy 2006).

Reiser: Unbeabsichtigte genetische Veränderungen könnten eintreten, falls die genetischen Konstrukte (oder Teile davon) aus dem Wurzelstock via «horizontalen Transfer» in den Reiser gelangen. Wie eine Untersuchung an transgenem Tabak zeigt, tauschen Reiser und Wurzelstock zwar genetisches Material aus, aber nur in der unmittelbaren Umgebung der Pfropfstelle (Stegemann & Bock 2009, Rusk 2009). Smolka et al. (2010) fanden bei Apfelpfropfen keine Hinweise darauf, dass das Transgen aus dem Wurzelstock in den Reiser transportiert wird. Haroldsen et al. (2012a), Lusser et al. (2011), Schaart & Visser (2009) und COGEM (2006a) gehen davon aus, dass ein Gentransfer über weite Strecken und damit auch in reproduktive Zellen des Reisers unwahrscheinlich ist<sup>14</sup>. Unbeabsichtigte Wirkungen sind möglich, falls aus dem Wurzelstock solche Substanzen ungewollt in den Reiser transportiert werden, die mit der gentechnischen Veränderung verbunden sind (Lusser et al. 2011, Schaart & Visser 2009, COGEM 2006a). Ob Proteine, Transkripte (mRNA) oder siRNAs vom Wurzelstock in den Reiser verfrachtet werden, ist in verschiedenen Arbeiten untersucht worden (z.B. Nagel et al. 2010, Smolka et al. 2010, Hemmer et al. 2009, Youk et al. 2009, Dutt et al. 2007, Kudo & Harada 2007, Tournier et al. 2006, Bortolotti et al. 2005, Gomez et al. 2005, Hewezi et al. 2005, Ayre & Turgeon 2004, Kim et al. 2001, Ruiz-Medrano et al. 1999, Golecki et al. 1998). Die Resultate dieser Untersuchungen sind teilweise inkonsistent, weshalb davon auszugehen ist, dass der ungewollte Transport der Genprodukte abhängig ist von den Eigenschaften der Transkripte beziehungsweise der exprimierten Proteine sowie deren Kompatibilität mit der Translokationsmaschinerie der jeweiligen Pflanzenart (Nagel et al. 2010). Unbeabsichtigte Wirkungen in den Reisern können divers sein und sich von Fall zu Fall unterscheiden (Schaart & Visser 2009).

### **3.9.6 Sicherheitsaspekte**

Welche Sicherheitsaspekte mit dem Pfropfen von herkömmlichen Reisern auf gentechnisch veränderte Wurzelstöcke verbunden sind, hängt unter anderem von der jeweiligen Anwendung (Abschnitt 3.9.2), von den in die Wurzelstöcke transferierten genetischen Konstrukte sowie von der Kompatibilität der Produkte der genetischen Konstrukte mit der Translokationsmaschinerie der jeweiligen Pflanzenart ab.

Falls die Chimären freigesetzt oder in Verkehr gebracht werden, kommt es zu Interaktionen zwischen dem gentechnisch veränderten Wurzelstock mit dem Boden und den darin vorkommenden Lebewesen. Abhängig von der Art der gentechnischen Veränderung können daraus Wirkungen auf die Bodenbiodiversität resultieren (Schaart & Visser 2009). Da weder Pollen noch Samen des Reisers gentechnisch veränderte Sequenzen enthalten, ist bei freigesetzten oder in

---

<sup>14</sup> Gemäss Liu et al. (2010b) deuten ältere Untersuchungen darauf hin, dass Reiser genetisches Material von Wurzelstöcken aufnehmen und weitervererben können. Die in diesen Untersuchungen beobachteten vererbten Veränderungen dürften jedoch auf epigenetische Modifikationen zurückzuführen sein (Haroldsen et al. 2012a).

Verkehr gebrachten Chimären ein Genfluss nur dann möglich, falls sich am gentechnisch veränderten Wurzelstock Wurzelschösslinge<sup>15</sup> bilden und diese zur Blüte gelangen (COGEM 2006a).

Falls die Wirkungen der gentechnischen Veränderung auf den Wurzelstock begrenzt sind, kann der Reiser sowie dessen Produkte als gleich sicher bewertet werden wie Reiser der gleichen Pflanzenart, die auf herkömmliche Wurzelstöcke gepfropft worden sind.

Werden Proteine, Transkripte (mRNA) oder siRNAs, die mit der gentechnischen Veränderung des Wurzelstockes verbunden sind, in den Reiser transportiert, können der Reiser sowie dessen Produkte einen veränderten Phänotyp aufweisen. Ob der veränderte Phänotyp sicherheitsrelevante Fragen hervorruft hat, ist von Fall zu Fall zu beurteilen.

In den Fällen, in denen der Wurzelstock mit RNAi-Konstrukten transformiert wird, kann dies zu einer RNA-dirigierten DNA Methylierung im Reiser führen. Der durch diese Methylierung entstehende Phänotyp kann unter Umständen an die Nachkommen weiter vererbt werden (Schaart & Visser 2009).

### **3.9.7 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden<sup>16</sup>**

Erkennung: Eine Chimäre aus einem herkömmlichem Reiser und einem gentechnisch veränderten Wurzelstock lässt sich wie jede andere gentechnisch veränderte Pflanze erkennen. Nachkommen und Ernteprodukte des Reisers sind mit PCR-Methoden nicht erkennbar, da die DNA-Sequenz des Reisers nicht verändert worden ist (Lusser et al. 2011).

Identifikation: Eine Chimäre aus einem herkömmlichem Reiser und einem gentechnisch veränderten Wurzelstock lässt sich wie jede andere gentechnisch veränderte Pflanze identifizieren. Nachkommen und Ernteprodukte des Reisers sind mit PCR-Methoden nicht identifizierbar, da die DNA-Sequenz des Reisers nicht verändert worden ist (Lusser et al. 2011).

### **3.9.8 Aspekte der GVO-Klassierung**

Chimären aus einem herkömmlichen Reiser und einem gentechnisch veränderten Wurzelstock fallen in den Geltungsbereich der Gentechnikgesetzgebung, da der Wurzelstock gentechnisch verändert ist. Beim Herstellen, Freisetzen und in Verkehrbringen von Chimären gelten damit die Bestimmungen der ESV beziehungsweise FrSV. Auch wenn klar ist, dass die Chimären aus regulatorischer Sicht als GVO zu behandeln sind, stellt sich die Frage wie der Reiser selbst sowie Stecklinge und Samen, die von ihm gewonnen werden, als GVO zu klassieren sind oder nicht.

Eine Diskussion der GVO-Klassierung im Lichte der EU-Richtlinie 2001/18/EG findet sich in NTWG (2011) und ZKBS (2012).

#### *3.9.8.1 Reiser*

Ob der Reiser gemäss FrSV als GVO zu betrachten ist, könnte davon abhängen, ob die Pfropfchimäre rechtlich gesehen als eine Pflanze/Sorte oder zwei Pflanzen/Sorten gilt (COGEM 2006a). Der Reiser an und für sich weist im Vergleich zu Herkunftspflanze keine genetischen Veränderungen auf, die auf eine gentechnische Methode gemäss Anhang 1 Abs. 1 FrSV zurückgehen. Falls eine Pfropfchimäre rechtlich als zwei Pflanzen/Sorten gilt, wäre der Reiser an und für sich somit nicht als GVO gemäss Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV zu klassieren. Gälte die Chimäre hingegen als eine Pflanze/Sorte, könnte auch der Reiser als GVO zu klassieren sein.

---

<sup>15</sup> Wurzelschösslinge (auch Wurzelschösser genannt) können sich am Wurzelstock bilden, aber auch aus den Wurzeln entstehen. Die Bildung von Wurzelschösslingen ist Arten-abhängig.

<sup>16</sup> Mit Erkennung ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte festzustellen und zwar in Bezug auf eine geeignete Vergleichssorte. Mit Identifikation wiederum ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte als Veränderung zu erkennen, die absichtlich durch ein bestimmtes Verfahren eingeführt worden ist.

### 3.9.8.2 Stecklinge und Samen

Aus einer Chimäre aus einem Reiser und einem gentechnisch veränderten Wurzelstock können zwei Arten von Stecklingen und Samen gewonnen werden: Stecklinge und Samen aus Wurzelschösslingen sowie Stecklinge und Samen aus dem Reiser. Im ersten Fall enthalten Stecklinge und Samen die eingeführten genetischen Konstrukte in ihrem Erbgut, weshalb sie gemäss Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV als GVO zu klassieren sind. Inwiefern Stecklinge und Samen aus dem Reiser als GVO zu klassieren sind, könnte wiederum von der Antwort auf die Frage abhängen, ob die Pfropfchimäre als eine Pflanze gilt oder zwei (siehe 3.9.8.1). Gälte auch der Reiser als GVO, wäre zu prüfen, ob Stecklinge und Samen als Nachkommen eines GVO ebenfalls als GVO zu klassieren wären. Falls der Reiser nicht als GVO gilt, dürften auch seine Samen und Stecklinge im Sinne von Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV nicht als GVO gelten, da sie keine Veränderungen an ihrem genetischen Material aufweisen. Da die FrSV keine Bestimmungen dazu enthält, wie Organismen, die von GVO abstammen, zu klassieren sind, ist unklar, ob ein etwaiger GVO-Status des Reisers einen Einfluss darauf hat, wie seine Stecklinge zu klassieren sind.

In den Fällen, in denen der Wurzelstock mit RNAi-Konstrukten transformiert wird, kann dies zu einer RNA-dirigierten DNA Methylierung im Reiser führen. Der durch solche Methylierungen entstehende Phänotyp kann unter Umständen an die Nachkommen weiter vererbt werden. Damit stellt sich die Frage, ob unbeabsichtigte Methylierungen einen Einfluss auf die GVO-Klassierung haben könnten. Gemäss Wortlaut von Art. 3 Abs. 1 Bst. d FrSV spielen bei der Legaldefinition von GVO nicht «genetische Veränderungen» eine Rolle, sondern «Veränderungen des genetischen Materials». Wissenschaftlich betrachtet sind Epiallele keine genetischen, sondern epigenetische Veränderungen; sie könnten aber als Veränderung des genetischen Materials angesehen werden (siehe dazu auch Abschnitt 3.4.8).

## 3.10 Zinkfinger-Nukleasen-Technik

Die Zinkfinger-Nukleasen-Technik ist ein Züchtungsverfahren, bei dem Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) dazu benutzt werden, um im Erbgut von Pflanzen Gene gezielt auszuschalten, Gene gezielt zu korrigieren oder neue Gene an einem vorbestimmten Ort einzufügen (Kim & Kim 2011, Weinthal et al. 2010, Urnov et al. 2010). Die ZFN-Technik kann – je nach Anwendung – zu Sorten führen, die frei von extrazellulär eingeführten Sequenzen sind (Vainstein et al. 2011, Marton et al. 2010, Puchta & Hohn 2010).

Wie die Meganukleasen- und TALEN-Techniken (Abschnitte 3.11.1 und 3.11.2) wird auch die ZFN-Technik der *targeted genetic modification* (TagMo)-Technik (Kuzma & Kokotovitch 2011) oder der NRE-Technik (NRE = *new restriction enzymes*; Tzfira et al. 2012) zugeordnet.

### 3.10.1 Beschreibung des Verfahrens

Die ZFN-Technik beruht auf dem Einsatz von ZFN und der Ausnutzung des zelleigenen DNA-Reparaturprozesses der Pflanzen (Porteus 2009).

ZFN sind synthetisch hergestellte Restriktionsenzyme und bestehen aus einer Fusion zwischen einer künstlichen Zinkfinger-Domäne und einer Nukleasen-Domäne. Die Zinkfinger-Domäne kann dabei so hergestellt werden, dass sie eine bestimmte Stelle im Erbgut erkennt und dort an die DNA bindet (Carroll et al. 2006, Durai et al. 2005, Porteus & Carroll 2005). Die Nuklease-Domäne schneidet einen Strang der doppelsträngigen DNA neben der Erkennungssequenz der Zinkfinger-Domäne. In der ZFN-Technik werden jeweils zwei ZFN mit gegenläufigen Erkennungssequenzen

eingesetzt, so dass die beiden Strangsnitte zu einem Doppelstrangbruch zwischen den Erkennungssequenzen führen. Dort, wo die ZFNs einen Doppelstrangbruch ins Erbgut eingefügt haben, beginnt der zelleigene Reparaturprozess. Die Reparatur des Doppelstrangbruchs erfolgt dabei entweder durch nicht-homologe Verknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ) oder, falls ein doppelsträngiges DNA-Molekül mit Homologie zu den beiden Seiten des Doppelstrangbruchs vorhanden ist, durch homologe Rekombination (HR). Das NHEJ führt an der Bruchstelle zur Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden. Die HR wiederum hat zur Folge, dass es je nach Reparaturmatrize an der Bruchstelle zum Austausch von bestimmten Nukleotiden oder zur Insertion einer neuen Nukleotidsequenz kommt.

Um ZFN nutzen zu können, müssen die ZFN in Pflanzenzellen eingeschleust werden. Das Einschleusen kann theoretisch entweder in Form von Proteinen, in Form von mRNA oder in Form von DNA erfolgen. Praktisch ist der Weg via DNA bisher die einzige Einschleusungsform, deren Machbarkeit an Pflanzen in der Literatur beschrieben worden ist (siehe unten). Nach Angaben von Lusser et al. (2011) und COGEM (2009a) wird der Weg via Proteine gegenwärtig erprobt.

Um ZFN-kodierende Gene in Pflanzenzellen einzubringen, werden gegenwärtig drei unterschiedliche gentechnische Strategien angewandt: Transformation, transiente Transfektion und VUGE (Tzfira et al. 2012, Mahfouz & Li 2011; Abbildung 8). Zudem könnte es auch möglich sein, die Agroinfiltration für den Transfer von ZFN-Genen zu nutzen (Mahfouz & Li 2011). Da ZFN als Heterodimere wirken, müssen jeweils zwei ZFN-Gene eingebracht werden (Lusser et al. 2011).

#### *3.10.1.1 Transformation*

Die ZFN-Gene können mit den üblichen Transformationsmethoden wie zum Beispiel der Biolistik oder dem Gentransfer mit Hilfe von Agrobakterien in das Erbgut von Pflanzen inseriert werden (z.B. Even-Faitelson et al. 2011, Tovkach et al. 2009). In den transformierten Pflanzen kommt es zu einer stabilen oder induzierbaren Expression und die resultierenden ZFN führen am vorbestimmten Ort des Genoms einen Doppelbruch ein. Am Ende des Prozesses können die eingeführten ZFN-Gene via Segregation entfernt werden, womit Sorten entstehen können, die frei von extrazellulär eingeführten Sequenzen sind.

#### *3.10.1.2 Transiente Transfektion*

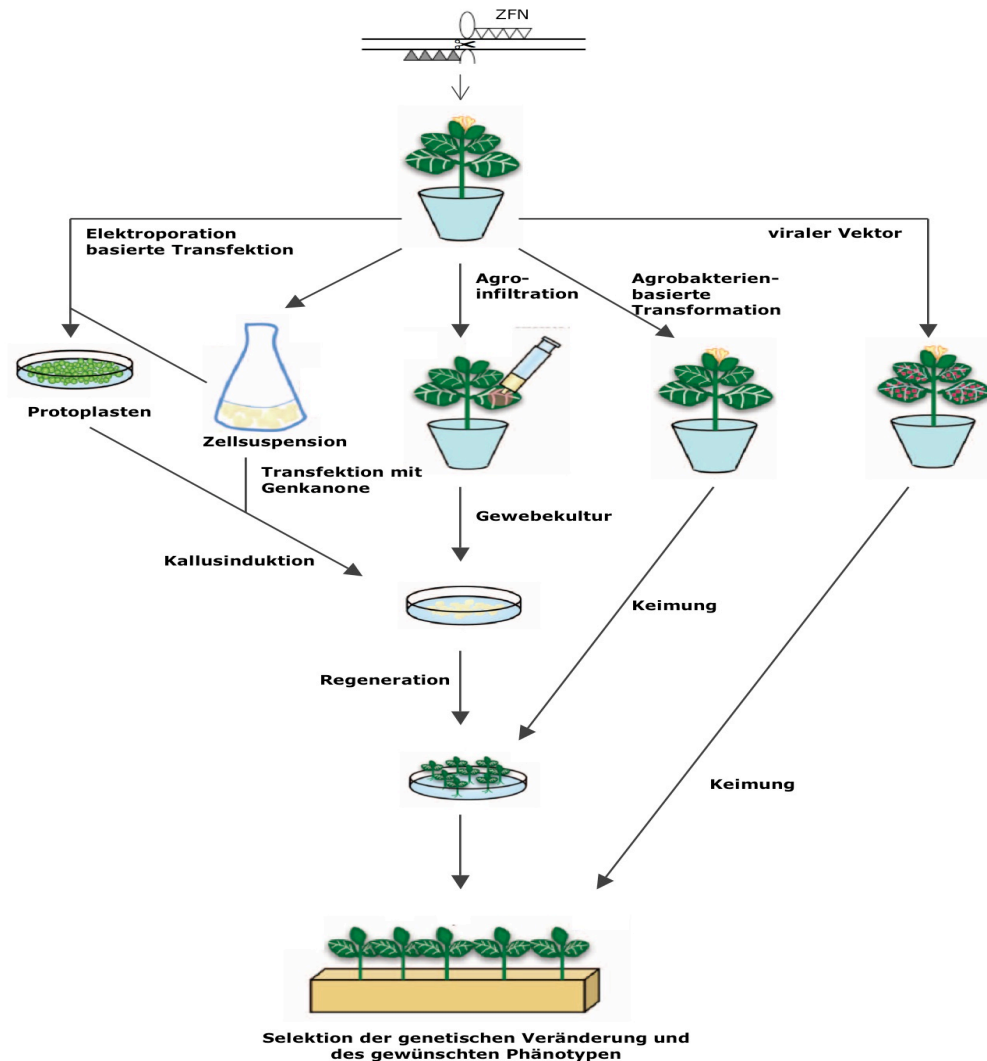
Die ZFN-Gene können via transiente Transfektion vorübergehend in Protoplasten oder Zellsuspensionen eingebracht werden (z.B. Cai et al. 2009, Townsend et al. 2009, Wright et al. 2005). In den transfektierten Protoplasten beziehungsweise Zellen werden die ZFN-Gene exprimiert und die produzierten ZFN führen am vorbestimmten Ort des Genoms einen Doppelbruch ein. Da bei der transienten Transfektion keine stabile Insertion ins Erbgut beabsichtigt wird, können regenerierte Pflanzen gewonnen werden, die frei von extrazellulär eingeführten Sequenzen sind.

#### *3.10.1.3 VUGE*

Die ZFN-Gene können mit viralen Vektoren (VUGE-Verfahren, Abschnitt 3.11.8) vorübergehend in Pflanzen eingeführt werden (Vainstein et al. 2011, Marton et al. 2010). In der infiltrierten Pflanze breitet sich der rekombinante Virus aus, die ZFN-Gene werden exprimiert und die ZFN führen am vorbestimmten Ort des Genoms einen Doppelbruch ein. Je nach eingesetztem Virus lassen sich auf drei Wegen Virus-freie Nachkommen gewinnen (Vainstein et al. 2011): (I) Regeneration von mutiertem Gewebe und eventueller Eliminierung der Viren durch eine Meristemkultur; (II) Vegetative Vermehrung von mutierten Seitentrieben und eventueller Eliminierung der Viren durch



eine Meristemkultur, (III) Gewinnung Virus-freier Samen, falls sich aus mutierten Trieben Blüten bilden und der eingesetzte Virus nicht via Samen übertragen wird.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung möglicher Strategien zum Einführen von ZFN-kodierenden Genen in Pflanzenzellen (nach Darstellung für TALEN von Mahfouz & Li 2011). ZFN-Gene können vorübergehend in Zellen exprimiert werden, wenn sie in Plasmiden in Protoplasten oder Zellsuspensionen transfektiert werden. Die transfektierten Zellen können regeneriert werden. Alternativ kann eine vorübergehende Expression auch erreicht werden, wenn die ZFN-Gene via Agroinfiltration in Blattzellen gebracht werden. Die agroinfiltrierten Zellen können wiederum durch eine Gewebekultur regeneriert werden. Falls es bei der Transfektion bzw. der Agroinfiltration nicht zur Insertion der ZFN-Gene ins Erbgut der Pflanzenzellen kommt, können auf diesen Wegen Pflanzen regeneriert werden, die frei von ZFN-Genen sind und allein die durch die ZFN induzierte genetische Veränderung aufweisen. Eine stabile Expression der ZFN-Gene ist möglich, falls sie via Agrobakterien-basierenden Transfermethoden ins Erbgut der Pflanze inseriert werden. In diesem Fall können Pflanzen ohne ZFN-Gene entstehen, wenn die ZFN-Gene am Ende des Änderungsprozesses wieder ausgekreuzt werden. Die Verwendung von viralen Vektoren (VUGE-Verfahren) bietet eine weitere Möglichkeit, um ZFN-Gene in Pflanzenzellen einzubringen. Ist der eingesetzte Virus nicht via Samen übertragbar, lassen sich Pflanzen auskeimen, die frei vom viralen Vektor und damit auch frei von ZFN-Genen sind. Quelle der Bilder: Mahfouz & Li (2011).

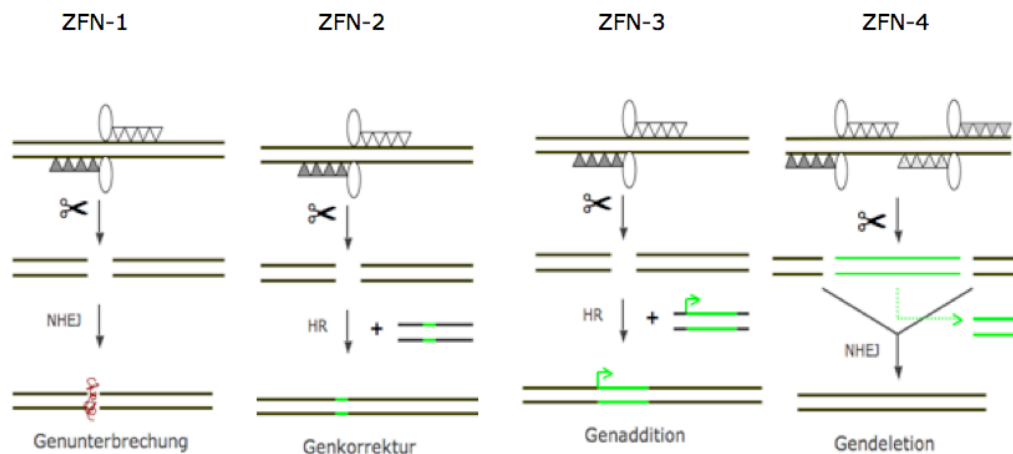
### 3.10.1.4 Agroinfiltration

Die ZFN-Gene könnten via Agroinfiltration (Abschnitt 3.1) vorübergehend in Pflanzengewebe eingeführt werden (Mahfouz & Li 2011). In den infiltrierten Geweben werden die ZFN-Gene exprimiert und die produzierten ZFN führen am vorbestimmten Ort des Genoms einen Doppelbruch ein. Zellen des infiltrierten Gewebes können entnommen werden und *in vitro* zu Pflanzen regeneriert werden. Da die Agroinfiltration ohne Insertion der eingeführten Sequenzen ablaufen kann, können regenerierte Pflanzen gewonnen werden, die frei von den extrazellulär eingeführten Sequenzen sind. Gegenwärtig lassen sich in der Literatur keine Beispiele finden, in denen die ZFN-Gene via Agroinfiltration in Pflanzenzellen eingeschleust worden sind.

### 3.10.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Die ZFN-Technik gilt – zusammen mit den anderen beiden NRE-Techniken (Abschnitte 3.11.1 und 3.11.2) – als besonders viel versprechendes neues Verfahren für die Pflanzenzüchtung, ermöglicht sie doch nicht nur die gezielte Genmutagenese durch NHEJ sondern auch das Gentergeting durch HR (z.B. Curtin et al. 2012, Tzfira et al. 2012, Kim & Kim 2011).

Die ZFN-Technik kann in der Pflanzenzucht auf verschiedene Art und Weise angewendet werden. Theoretisch sind die im Folgenden näher beschriebenen vier Varianten ZFN-1 bis ZFN-4 möglich (Kim & Kim 2011, Urnov et al. 2010; siehe auch Abbildung 9). Gemäss Lusser et al. (2011) werden gegenwärtig in der Praxis die Varianten ZFN-1, ZFN-2 und ZFN-3 angewandt.



**Abbildung 9:** Vereinfachte schematische Darstellung von ZFN-1, ZFN-2, ZFN-3 und ZFN-4. Zur näheren Beschreibung der Varianten siehe Haupttext.

#### 3.10.2.1 ZFN-1

Die ZFN beziehungsweise ZFN-Gene werden ohne Reparaturmatrize in die Pflanzenzellen eingefügt. Innerhalb der Zellen binden die ZFN an die DNA und fügen einen Doppelstrangbruch ein. Die beiden Stränge werden durch das NHEJ wieder zusammengefügt. Das Zusammenfügen der Stränge erfolgt dabei so, dass es an der Bruch- beziehungsweise an der Verbindungsstelle zum Austausch von Basen oder zu kurzen Deletionen oder Insertionen von Basen kommen kann (Lusser et al. 2011). ZFN-1 ermöglicht die gezielte Genmutagenese (*targeted gene mutagenesis*, TGM). Liegt die Bruchstelle innerhalb einer Protein-kodierenden Sequenz, so können die durch das

NHEJ eingeführten Mutationen zu einer Änderung des Leserahmens und damit zu einer Trunkierung des Zielproteins führen (Kim & Kim 2011).

Die gezielte Genmutagenese bietet gegenüber der klassischen Mutagenese mit Chemikalien oder Strahlen den sicherheitsrelevanten Vorteil, dass weniger unbeabsichtigte Veränderungen am Erbgut erfolgen.

#### 3.10.2.2 ZFN-2

Die ZFN beziehungsweise ZFN-Gene werden zusammen mit einer Reparaturmatrize in die Pflanzenzellen eingefügt. Die Matrize ist einige Kilobasenpaare lang und abgesehen von den auszutauschenden Nukleotiden homolog zur chromosomalen Sequenz, in der die ZFN einen Doppelstrangbruch einführen (Lusser et al. 2011). Die Reparatur der Bruchstelle erfolgt durch homologe Rekombination zwischen den gebrochenen Genomsequenzen und der beigefügten Matrize. ZFN-2 ermöglicht das Gtargeting (*gene targeting*, GT) beziehungsweise das gezielte Korrigieren und Editieren von Genen oder das gezielte Zerstören von Genen (Kim & Kim 2011).

#### 3.10.2.3 ZFN-3

Die ZFN beziehungsweise ZFN-Gene werden zusammen mit einem DNA-Strang in Pflanzenzellen eingefügt. Der DNA-Strang ist mehrere Kilobasenpaare lang und seine Enden sind homolog zur DNA-Sequenz, welche die Bruchstelle der ZFN flankieren. Die Reparatur der Bruchstelle erfolgt durch homologe Rekombination zwischen den gebrochenen Genomsequenzen und den dazu homologen Enden des beigefügten DNA-Stranges. ZFN-3 ermöglicht das GT beziehungsweise die gezielte Insertion eines oder mehrerer Gene ins Erbgut einer Pflanze sowie das gezielte Ausschalten eines Gens (Kim & Kim 2011, Urnov et al. 2010). Die neu inserierten Gene können Cisgene, Intragene oder Transgene sein. Möglich ist auch die Insertion von RNAi-Konstrukten. Im Vergleich zu den herkömmlichen Gentransfermethoden bietet ZFN-3 den Vorteil, dass die Insertion der Gene an einem vorbestimmten Ort im Genom erfolgt und somit mögliche Nebenwirkungen des Gentransfers wie Positionseffekte oder Insertionsmutationen vermindert oder vermieden werden können. Mit ZFN-3 lässt sich neben der Insertion neuer Gene gleichzeitig auch eine Insertionsmutation an einer vorbestimmten Stelle erzeugen.

#### 3.10.2.4 ZFN-4

Zwei verschiedene ZFN-Heterodimere beziehungsweise die korrespondierenden ZFN-Gene werden in Zellen eingefügt. Innerhalb der Zelle fügen die ZFN zwei Doppelstrangbrüche ein, die dann durch NHEJ verbunden werden. Liegen die beiden Doppelstrangbrüche auf demselben Chromosom, gehen die genetischen Informationen zwischen den beiden Brüchen verloren (Kim & Kim 2011, Urnov et al. 2010). ZFN-4 ermöglicht somit die Entfernung von Genen aus dem Erbgut. Liegen die beiden Brüche auf unterschiedlichen Chromosomen, kann es zu einer Translokation genetischer Information kommen (Kim & Kim 2011).

### 3.10.3 Stand der Entwicklung

2005 ist in der Literatur zum ersten Mal berichtet worden, dass sich Modellpflanzen wie Tabak und Arabidopsis mit der ZFN-Technik verändern lassen (Lloyd et al. 2005, Wright et al. 2005). Weitere Untersuchungen an den beiden Modellpflanzen folgten, wobei gezeigt wurde, dass sowohl ZFN-1 wie ZFN-2 als auch ZFN-3 umsetzbar sind (Even-Faitelson et al. 2011, Osakabe et al. 2010, Zhang et al. 2010b, De Pater et al. 2009, Tovkach et al. 2009, Townsend et al. 2009, Zeevi et al. 2008). Veröffentlichungen zu Anwendungen der ZFN-Technik bei Kulturpflanzenarten gibt es bei Mais (Shukla et al. 2009), Soja (Curtin et al. 2011) und Petunie (Marton et al. 2010).

In einer im Jahr 2010 im Auftrag der EU Kommission durchgeführten Umfrage bei Pflanzenzuchtunternehmen gaben die befragten Firmen an, dass sie ZFN-1, ZFN-2 und ZFN-3 anwenden und zwar bei der Züchtung neuer Mais-, Raps- und Tomatensorten (Lusser et al. 2011).

Lusser et al. (2011) gehen davon aus, dass die ersten mit der ZFN-Technik gezüchteten Sorten in zwei bis drei Jahren auf den Markt kommen könnten – vorausgesetzt jedoch, dass die Sorten nicht unter die Gentechnikgesetzgebung fallen.

### **3.10.4 Beabsichtigte Veränderungen und Wirkungen**

ZFN-1: Die beabsichtigte genetische Veränderung ist die Erzeugung einer Mutation an einer vorbestimmten Stelle des Erbguts. Die beabsichtigte Wirkung hängt von der mutierten Sequenz ab.

ZFN-2: Die beabsichtigte genetische Veränderung ist ein gezielter Basenaustausch in vorbestimmten Sequenzen des Erbguts. Die beabsichtigte Wirkung hängt davon ab, welche Basen an welchen Sequenzen ausgetauscht werden.

ZFN-3: Die beabsichtigte genetische Veränderung ist die ortspezifische Insertion von Cisgenen, Intragenen, Transgenen oder RNAi-Konstrukten und gegebenenfalls die gleichzeitige Erzeugung einer Insertionsmutation. Die beabsichtigte Wirkung hängt davon ab, welche Sequenzen ins Erbgut inseriert werden, und gegebenenfalls auch davon, welche Insertionsmutation gleichzeitig erzeugt wird.

ZFN-4: Die beabsichtigte genetische Veränderung ist die Deletion vorbestimmter endogener Sequenzen. Die beabsichtigte Wirkung hängt davon ab, welche Sequenzen aus dem Erbgut entfernt werden.

### **3.10.5 Unbeabsichtigte Veränderungen und Wirkungen**

Die beim ZFN-Verfahren möglichen unbeabsichtigten Veränderungen und Wirkungen können im Rahmen des vorliegenden Projektes aus zeitlichen Gründen nicht behandelt werden. Die verschiedenen Varianten, die beim ZFN-Verfahren anwendbar sind, dürften sich hinsichtlich unbeabsichtigter Veränderungen und Wirkungen unterscheiden, weshalb sie separat behandelt werden müssten. Die verschiedenen möglichen Varianten ergeben sich aus folgenden Gründen: Erstens lassen sich ZFN als Proteine, als mRNA oder als DNA einfügen. Zweitens kann – falls ZFN in Form von Genen eingeführt eine der drei Strategien Transformation, transiente Transfektion und VUGE eingesetzt werden. Drittens sind die vier Varianten ZFN-1 bis ZFN-4 möglich. Viertens lässt sich ZFN-3 auch im Zusammenhang mit der Cisgenese und Intragenese darstellen.

### **3.10.6 Sicherheitsaspekte**

Die Aspekte, die bei der Bewertung der Sicherheit des ZFN-Verfahrens eine Rolle spielen könnten, können im Rahmen des vorliegenden Projektes nicht behandelt werden. Die verschiedenen Varianten, die beim ZFN-Verfahren anwendbar sind, dürften sich hinsichtlich der relevanten Sicherheitsaspekte unterscheiden, weshalb sie separat behandelt werden müssten. Siehe dazu auch Abschnitt 3.10.5.

### **3.10.7 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden<sup>17</sup>**

ZFN-1 und ZFN-2: Falls Vorwissen zur veränderten Erbgutsequenz vorhanden ist, lassen sich ZFN-1- und ZFN-2-Produkte mit DNA-basierten Nachweismethoden erkennen. Eine Identifikation hinge-

---

<sup>17</sup> Mit Erkennung ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte festzustellen und zwar in Bezug auf eine geeignete Vergleichssorte. Mit Identifikation wiederum ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material einer neuen Sorte als Veränderung zu erkennen, die absichtlich durch ein bestimmtes Verfahren eingeführt worden ist.

gen ist nach Lusser et al. (2011) nicht möglich, da sich ZFN-1- und ZFN-2-Produkte auf molekularer Ebene nicht unterscheiden lassen von Produkten, die aus der Mutationszüchtung stammen oder natürliche Mutationen aufweisen.

ZFN-3: Falls Vorwissen zur veränderten Erbgutsequenz vorhanden ist, lassen sich ZFN-3-Produkte mit PCR-Methoden erkennen und identifizieren (Lusser et al. 2011).

ZFN-4: In den gesichteten Materialien sind keine Angaben zur Erkennung und Identifikation von Sorten aus ZFN-4-Verfahren gefunden worden. Da die Sorten eine genetische Veränderung aufweisen, könnten sie mit PCR-Methoden erkannt werden, falls Vorwissen zu den Veränderungen vorliegt.

### **3.10.8 Aspekte der GVO-Klassierung**

Die Aspekte, die bei der GVO-Klassierung von Sorten aus dem ZFN-Verfahren eine Rolle spielen könnten, können im Rahmen des vorliegenden Projektes nicht behandelt werden. Die verschiedenen Varianten, die beim ZFN-Verfahren anwendbar sind, dürften sich bei den Aspekten der GVO-Klassierung unterscheiden, weshalb sie separat behandelt werden müssten. Siehe dazu auch Abschnitt 3.10.5.

## **3.11 Weitere neue Pflanzenzuchtverfahren**

Im Laufe des vorliegenden Projektes sind neben den ursprünglich bekannten und oben beschriebenen Pflanzenzuchtverfahren weitere neue Verfahren entdeckt worden, die ebenfalls regulatorische Fragen aufwerfen dürften. Diese Verfahren werden in den folgenden Abschnitten kurz beschrieben. Nicht behandelt wird im Folgenden das ebenfalls neue Verfahren der Minichromosomen-Technik. Dieses Zuchtverfahren beruht darauf, Pflanzenzellen mit einem stabil vererbbares extra Chromosom auszustatten (Dhar et al. 2011, Birchler et al. 2010, Ananiev et al. 2009, Carlson et al. 2007). Es wird angenommen, dass diese Technik und die daraus entstehenden Produkte unter die Gentechnikgesetzgebung fallen.

### **3.11.1 TALEN-Technik**

Die TALEN-Technik nutzt synthetische TALE-Nukleasen (TALEN), um im Erbgut von Pflanzen Gene gezielt auszuschalten, Gene gezielt zu korrigieren oder neue Gene an einem vorbestimmten Ort einzufügen (Mahfouz & Li 2011, Bogdanove & Voytas 2011). Die TALEN-Technik kann je nach Anwendung zu Sorten führen, die frei von extrazellulär eingeführten Sequenzen sind.

Wie die ZFN- und Meganukleasen-Techniken (Abschnitte 3.10 und 3.11.2) wird auch die TALEN-Technik der *targeted genetic modification* (TagMo)-Technik (Kuzma & Kokotovich 2011) oder der NRE-Technik (NRE = *new restriction enzymes*; Tzfira et al. 2012) zugeordnet.

Nicht zur TALEN-Technik gerechnet wird die Herstellung künstlicher TALE-Transkriptionsfaktoren, die in der Züchtung gentechnisch veränderter Pflanzen eingesetzt werden könnten (z.B. Morbitzer et al. 2010).

#### *3.11.1.1 Beschreibung des Verfahrens*

Das Verfahren dürfte weitgehend identisch mit dem im Abschnitt 3.11.1 beschriebenen Verfahren der ZFN-Technik sein mit der Ausnahme, dass nicht ZFN zum Einsatz kommen sondern TALEN. TALEN sind synthetisch hergestellte Restriktionsenzyme und bestehen aus einer Fusion zwischen einer künstlichen DNA-Bindungsdomäne von Transkriptionsaktivator-ähnlichen Effektoren (TALE) und einer Nukleasen-Domäne des FokI-Proteins (Weber et al. 2011, Li et al. 2011). Die TALE-

Domäne kann dabei so designt werden, dass sie eine bestimmte Stelle im Erbgut erkennt und dort an die DNA bindet (Weber et al. 2011).

#### 3.11.1.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Die TALEN-Technik dürfte in der Pflanzenzucht die gleichen Anwendungen möglich machen wie die ZFN-Technik (siehe Abschnitt 3.10.2).

#### 3.11.1.3 Stand der Entwicklung

Die Möglichkeit, die DNA-Bindungsdomäne von TALE-Proteinen zur Herstellung künstlicher Restriktionsenzyme zu nutzen, ist 2009 erstmals beschrieben worden (Boch et al. 2009, Moscou & Bogdanove 2009). Seither haben mehrere Arbeitsgruppen künstliche TALEN entwickelt (Cermak et al. 2011, Li et al. 2011, Mahfouz et al. 2011, Mussolino et al. 2011, Christian et al. 2010). Hinsichtlich möglicher Anwendungen bei Pflanzen ist gezeigt worden, dass TALEN in Tabakblättern eine vorübergehend zugefügte Zielsequenz schneiden kann (Mahfouz et al. 2011). Bei Reis und Arabidopsis ist mittels TALEN eine NHEJ-vermittelte Mutagenese eines endogenen Gens erzielt worden (Li et al. 2012, Cermak et al. 2011).

Inwieweit die TALEN-Technik bereits von Pflanzenzuchtunternehmen angewendet wird, kann anhand des in dieser Arbeit gesichteten Materials nicht beantwortet werden.

### 3.11.2 Meganukleasen-Technik

Bei der Meganukleasen-Technik werden neu gestaltete Homing Endonukleasen genutzt, um im Erbgut von Pflanzen Gene gezielt auszuschalten, Gene gezielt zu korrigieren oder neue Gene an einem vorbestimmten Ort einzufügen (Gao et al. 2010). Die Meganukleasen-Technik kann je nach Anwendung zu Sorten führen, die frei von extrazellulär eingeführten Sequenzen sind.

Wie die ZFN- und TALEN-Techniken (Abschnitte 3.10 und 3.11.1) wird auch die Meganukleasen-Technik der *targeted genetic modification* (TagMo)-Technik (Kuzma & Kokotovich 2011) oder der NRE-Technik (Tzfira et al. 2012; NRE = *new restriction enzymes*) zugerechnet.

#### 3.11.2.1 Beschreibung des Verfahrens

Das Verfahren ist vergleichbar mit dem im Abschnitt 3.10.1 beschriebenen Verfahren der ZFN-Technik mit der Ausnahme, dass nicht ZFN zum Einsatz kommen sondern Meganukleasen. Meganukleasen sind neu designte Homing Endonukleasen (Puchta & Hohn 2010) und basieren meist auf der I-CreI-Endonuklease aus den Chloroplasten von *Chlamydomonas reinhardtii*.

#### 3.11.2.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Die Meganukleasen-Technik dürfte in der Pflanzenzucht vergleichbare Anwendungen möglich machen wie die ZFN-Technik (siehe Abschnitt 3.10.2).

#### 3.11.2.3 Stand der Entwicklung

Selten schneidende, unveränderte Endonukleasen sind bisher vereinzelt zur genetischen Veränderung von Pflanzen erprobt worden (Chilton & Que 2003, Tzfira et al. 2003, Salomon & Puchta 1998). Einer breiten Anwendung von Endonukleasen steht gegenwärtig hauptsächlich entgegen, dass es kaum gelingt, die Enzyme mit neuen DNA-Bindungsstellen auszustatten. Bisher findet sich in der Literatur ein Beispiel für die Anwendung einer neu gestalteten Endonuklease bei Pflanzen: Gao et al. (2010) nutzten eine modifizierte I-CreI-Nuklease zur gezielten Veränderung einer endogenen Sequenz in Mais.

### 3.11.3 Zentromer-vermittelte Genomelimination

Das Verfahren der Zentromer-vermittelten Genomelimination nutzt gentechnische Methoden dazu, um Haploiden-Induktionslinien zu erzeugen, und ermöglicht damit die Herstellung doppelhaploider Pflanzen (Ravi & Chan 2010). Da die gentechnische Veränderung im Endprodukt nicht mehr benötigt wird, können Sorten entstehen, die frei von extrazellulär eingeführten Nukleinsäuren sind (Chan 2010).

Die Zentromer-vermittelte Genomelimination kann dem *chromosome engineering* zugerechnet werden (Chan 2010). Im Englischen wird das Verfahren auch als *CCE-technique* (*centromere-mediated chromosome elimination technique*) bezeichnet (APHIS 2011e).

#### 3.11.3.1 Beschreibung des Verfahrens

Die Zentromer-vermittelte Genomelimination ist vergleichbar mit dem Verfahren der *in vivo* Haploideninduktion, wie sie beispielsweise bei der Hybridmaiszüchtung praktiziert wird (Prigge et al. 2012).

Bei der Zentromer-vermittelten Genomelimination werden gentechnisch veränderte Haploiden-Induktionslinien hergestellt (Chan 2010). Werden  $F_1$ -Hybride mit diesen Induktionslinien gekreuzt, entstehen unter anderem Nachkommen, die haploid sind und nur Chromosomen der  $F_1$ -Hybride enthalten. Aus den haploiden Pflanzen können spontan oder nach Anwendung von Chromosomensatzverdoppelungsmethoden doppelhaploide Pflanzen entstehen (Abbildung 10).

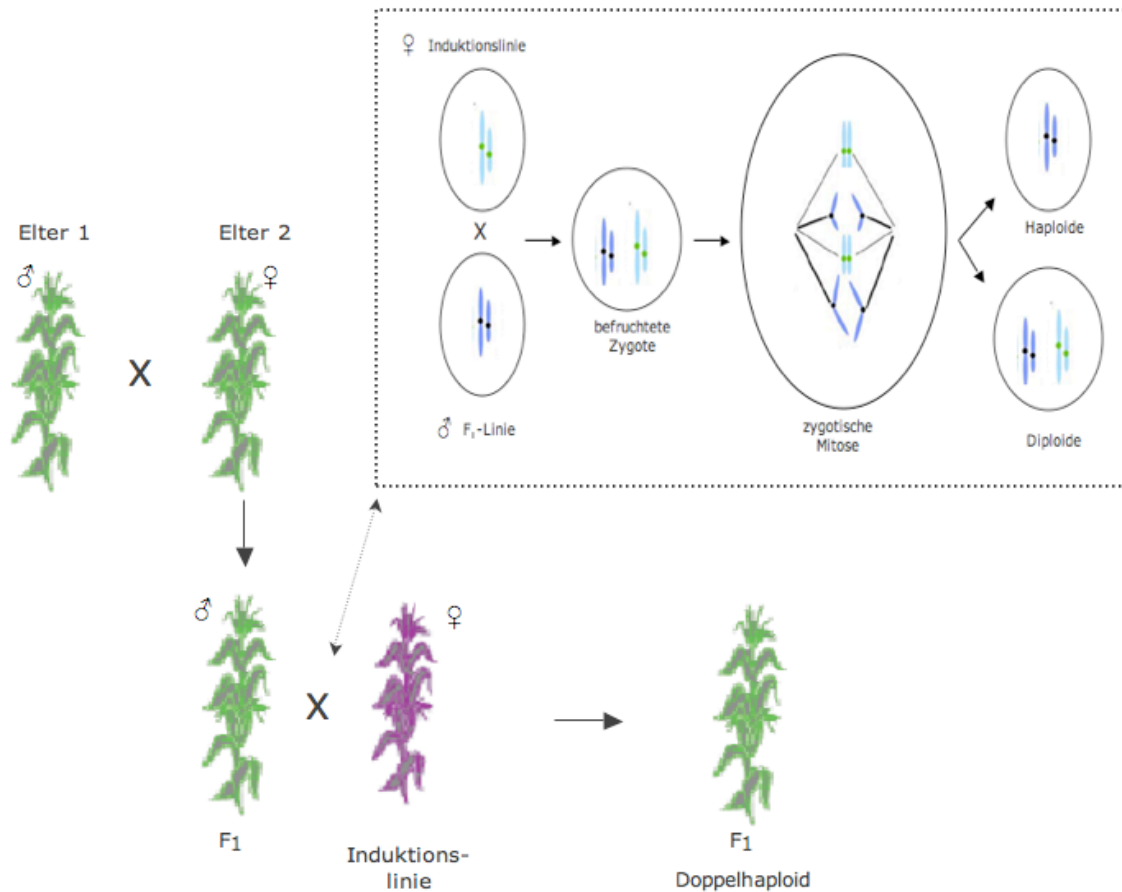
#### 3.11.3.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Die Zentromer-vermittelte Genomelimination bietet eine neue Möglichkeit, um doppelhaploide Pflanzen herzustellen (Chan 2010, Copenhaver & Preuss 2010). Doppelhaploide Pflanzen spielen in der Züchtung eine wichtige Rolle, weil Eigenschaften fixiert werden können, ohne dass Rückkreuzungen über mehrere Generationen vorgenommen werden müssen (Germana 2011a, Ferrie & Möller 2011).

Da das Verfahren den Transfer von parentalen Chromosomen in ein maternales Zytoplasma ermöglicht, lassen sich auch Pflanzen mit zytoplasmatischer männlicher Sterilität erzeugen (Chan 2010). Zudem könnte mit der Zentromer-vermittelten Genomelimination bei polyploiden Pflanzen die Ploidie halbiert werden. Diskutiert wird des Weiteren eine mögliche Kombination mit dem *Reverse breeding* (Stower 2012, Wijnker et al. 2012).

#### 3.11.3.3 Stand der Entwicklung

Die Zentromer-vermittelte Genomelimination ist 2010 erstmals an der Modellpflanze *Arabidopsis* gezeigt worden (Ravi & Chan 2010). Seither werden das Konzept und mögliche Anwendungen des Verfahrens diskutiert (Bhat 2011, Brownfield & Köhler 2011, Segui-Simarro et al. 2011, Marimuthu et al. 2011, Chan 2010, Copenhaver & Preuss 2010). Anwendungen an Kulturpflanzen finden sich in der Literatur bisher nicht. Ob das neue Verfahren von Pflanzenzuchtunternehmen bereits eingesetzt wird, kann anhand der gesichteten Materialien nicht beantwortet werden.



**Abbildung 10:** Vereinfachte Darstellung der Zentromer-vermittelten Genomeliminierung. Eine  $F_1$ -Linie wird mit einer gentechnisch veränderten Haploiden-Induktionslinie gekreuzt. Nach der Befruchtung können in den Nachkommen die Chromosomen der Induktionslinie (hellblau) während der zygotischen Mitose in einem «Genomeliminierung» genannten Prozess verloren gehen. Ein gewisser Teil der Nachkommen kann deshalb haploid sein und nur Chromosomen der  $F_1$ -Linie besitzen. Die haploiden Pflanzen können spontan in doppelhaploide Pflanzen konvertieren oder nach chemischer Behandlung in doppelhaploide Pflanzen verwandelt werden, so dass am Schluss eine doppelhaploide  $F_1$ -Linie entsteht. Nach Chan (2010).

### 3.11.4 Induzierte Hypomethylierung

Beim Verfahren der induzierten Hypomethylierung werden gentechnische Methoden dazu benutzt, um in Pflanzen die Expression von DNA-Methyltransferasen oder anderen Regulatoren der DNA-Methylierung zu senken und damit epiallelische Variationen zu erzeugen (King et al. 2010). Da die gentechnische Veränderung im Endprodukt nicht mehr benötigt wird, können Sorten entstehen, die frei von extrazellulär eingeführten Nukleinsäuren sind.

Wie das RdDM-Verfahren (Abschnitt 3.4) kann die induzierte Hypomethylierung auch dem *epigenetic engineering* oder dem *transgenic construct driven breeding* zugerechnet werden.

#### 3.11.4.1 Beschreibung des Verfahrens

Die induzierte Hypomethylierung beruht auf der vorübergehenden Stilllegung von Genen, die für DNA-Methyltransferasen oder andere Regulatoren der DNA-Methylierung wie beispielsweise für den Chromatinremodellierungsfaktor DDM1 kodieren (King et al. 2010). Indem solche Gene in den Pflanzen stillgelegt werden, ändert sich an zufälligen Stellen des Erbguts das Methylierungsmuster. Da das veränderte Muster an die Nachkommen weitervererbt werden kann, lassen sich Phänotypen mit den gewünschten Epiallelen selektionieren.



Die Stilllegung der Gene kann mittels stabiler Transformation von RNAi-Konstrukten oder mittels VIGS erfolgen. Wird die Strategie der stabilen Transformation angewendet, können via Segregation Sorten hergestellt werden, die das eingeführte RNAi-Konstrukt nicht mehr besitzen. Falls VIGS zur Anwendung kommt, können Nachkommen ohne RNAi-Konstrukt entstehen, wenn ein viraler Vektor eingesetzt wird, der nicht via Samen übertragen wird (siehe dazu Abschnitt 3.2.1).

#### *3.11.4.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht*

Mit der induzierten Hypomethylation können in ausgewählten Sorten so genannte Epiallele erzeugt werden – das sind Allele, die zwar in ihrer DNA-Sequenz übereinstimmen, aber unterschiedlich exprimiert sind. Da die epigenetische Vielfalt die phänotypische Vielfalt und somit auch die Leistung von Pflanzen beeinflusst, könnte das Verfahren für die Pflanzenzüchtung interessant sein.

#### *3.11.4.3 Stand der Entwicklung*

Dass sich in Pflanzen epiallelische Variation mittels gentechnisch induzierter Hypomethylation erzeugen lassen, ist im Jahr 2008 an *ddm1*-RNAi transgenen Rübsen gezeigt worden (Fujimoto et al. 2008). Weitere Beispiele sind nicht bekannt. Das Verfahren dürfte deshalb noch weitgehend in der Erprobungsphase stecken (King et al. 2010).

### **3.11.5 Gezielte Mutagenese mittels T-DNA**

Die gezielte Mutagenese mittels T-DNA ist ein Gene-Targeting-Verfahren, das auf dem zelleigenen Prozess der homologen Rekombination beruht. Erfolgt das Verfahren ohne exogene positive Selektionsmarker, kann es als eine «saubere» Transformationstechnik bezeichnet werden, die zu Sorten führt, welche vergleichbar mit Sorten aus der herkömmlichen Mutationszüchtung sind (Saika & Toki 2011).

#### *3.11.5.1 Beschreibung des Verfahrens*

Das Ziel des Verfahrens ist, an einer vorbestimmten Sequenz des Erbguts gezielt eine oder mehrere Mutationen einzuführen. Falls die vorbestimmte Sequenz ein Gen ist, ist das Resultat ein Allelaustausch. Um die Mutationen einzuführen, wird als erstes eine DNA-Sequenz, die – abgesehen von den auszutauschenden Nukleotiden – homolog zur Zielsequenz ist, in eine T-DNA kloniert. Der Vektor mit der T-DNA wird dann in Agrobakterien gebracht und mit deren Hilfe in Pflanzenzellen eingeschleust, wo es schliesslich zur homologen Rekombination zwischen der eingeführten Sequenz und der endogenen Zielsequenz kommen kann (Saika et al. 2011, Endo et al. 2007). Die transformierten Zellen können zu Pflanzen regeneriert werden, wobei jene selektioniert werden, die ausschliesslich homologe Rekombinationen aufweisen. Regenerierte Pflanzen, in denen neben der homologen Rekombination zusätzlich zufällige Insertionen der T-DNA und/oder unerwünschte ektopische Rekombinationen stattfanden, werden aussortiert.

#### *3.11.5.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht*

Das Verfahren der gezielten Mutagenese mittels T-DNA könnte in der Pflanzenzucht ähnliche Anwendungen möglich machen wie das ODM-Verfahren (siehe Abschnitt 3.3), wobei im Vergleich zur ODM mehrere Mutationen gleichzeitig, das heisst in einem einzelnen Schritt, eingeführt werden können.

#### *3.11.5.3 Stand der Entwicklung*

Da bei der gezielten Mutagenese mittels T-DNA die Frequenz der homologen Rekombination tief ist, finden sich in der Literatur nur wenige Beispiele, in denen das Verfahren erfolgreich angewen-

det wurde (Molesini et al. 2012). Das Gene-Targeting ohne exogene Selektionsmarker ist bisher in zwei Fällen bei Reis beschrieben worden (Saika et al. 2011, Endo et al. 2007). Im ersten Fall resultierte ein herbizidtoleranter Reis (Endo et al. 2007), im zweiten Fall ein Reis, der mehr freies Tryptophan bildet als üblich (Saika et al. 2011, Saika & Toki 2011).

### **3.11.6 Gezielte chemische Mutagenese**

Die gezielte chemische Mutagenese ist ein Verfahren, bei dem an Oligonukleotide gekoppelte Mutagenzien in Pflanzenzellen eingeführt werden, um an vorbestimmten Stellen des Erbguts Mutationen auszulösen.

#### *3.11.6.1 Beschreibung des Verfahrens*

Werden mutagene Substanzen an Oligonukleotide gekoppelt, so lassen sich mit diesen gezielt an bestimmten Stellen des Erbgut Mutationen erzeugen (z.B. Benfield et al. 2008, Mezhevaya et al. 1999). Die Funktion der Oligos besteht dabei darin, die mutagene Substanz an die Zielsequenz zu lenken.

#### *3.11.6.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht*

Mit der gezielten chemischen Mutagenese könnten in der Pflanzenzucht ähnliche Anwendungen möglich werden wie bei der ODM (siehe Abschnitt 3.3).

#### *3.11.6.3 Stand der Entwicklung*

Laut COGEM (2006a) dürften Oligonukleotide mit inkorporierten Mutagenzien in naher Zukunft in der Pflanzenzüchtung eingesetzt werden. Konkrete Beispiele von Anwendungen an Pflanzen werden von COGEM (2006a) nicht genannt und auch in der Literatur konnten keine entsprechenden Arbeiten gefunden werden.

### **3.11.7 Seed Production Technology**

Die *Seed Production Technology* (SPT) ist ein Verfahren, das gentechnisch veränderte Erhaltungslinien dazu nutzt, um männlich-sterile Mutterlinien zu vermehren, die in der Produktion von Hybridsaatgut eingesetzt werden können (USDA 2011). Im Endprodukt, dem Hybridsaatgut, sind die gentechnischen Veränderungen der Erhaltungslinie nicht mehr enthalten. Da die SPT keine Entfahnung der Mutterlinien bedarf, lassen sich bei der Herstellung von Hybridsaatgut höhere Erträge und bessere Qualitäten erzielen.

#### *3.11.7.1 Beschreibung des Verfahrens*

Die SPT beruht auf dem Einsatz zweier unterschiedlicher Inzuchtlinien: einer männlich sterilen Mutterlinie und einer gentechnisch veränderten Erhaltungslinie, die denselben genetischen Hintergrund hat wie die Mutterlinie. Die männlich-sterile Mutterlinie wirkt bei der Produktion von Hybridsaatgut als weiblicher Elter. Da sie männlich-steril ist, kann sie sich nicht selber befruchten, weshalb die normalerweise bei der Hybridsamenproduktion notwendige Entfahnung entfällt. Um die männlich-sterile Mutterlinie selbst vermehren zu können, wird die gentechnisch veränderte Erhaltungslinie eingesetzt. Diese Linie enthält ein Konstrukt aus drei Genen: (I) ein Gen für ein männliches Fertilitätsprotein, das in den Antheren exprimiert ist; (II) ein Alpha-Amylase-Gen, das in den Pollenkörnern aktiv ist; sowie (III) ein in den Samen aktives *dsRed*-Gen. Anders als die männlich sterile Mutterlinie kann die Erhaltungslinie Pollen bilden. Die Hälfte der gebildeten Pollen enthält das eingeführte Genkonstrukt und ist unfruchtbar. Die andere Hälfte der Pollen enthält das Genkonstrukt nicht und ist fruchtbar.

Der Prozess der SPT besteht hauptsächlich aus drei Schritten: 1. Vermehrung der Erhaltungslinie, 2. Vermehrung der männlich-sterilen Mutterlinie, 3. Produktion des Hybridsaatguts, das in den Verkauf gelangt.

Bei der Vermehrung der Erhaltungslinie wird diese mit sich selbst befruchtet. Die resultierenden Samen sind entweder rot oder gelb, wobei nur die roten Samen das eingeführte Genkonstrukt enthalten und für die Vermehrung der männlich-sterilen Mutterlinie ausgewählt werden. Die Sortierung der roten und gelben Samen erfolgt dabei maschinell. Bei der Vermehrung der Mutterlinie sorgen dann die nicht-transgenen Pollen der gentechnisch veränderten Erhaltungslinie für die Bestäubung. Die im Vermehrungsfeld gebildeten Samen können wiederum maschinell nach gelben und roten Samen sortiert werden. Die gelben, nicht-transgenen Samen werden schliesslich zusammen mit Samen einer männlich-fertilen Elite-Inzuchtlinie in einem Vermehrungsfeld ausgesät. Die Ernte dieses Feldes besteht aus den Samen, die als Hybridsaatgut in den Verkauf gelangen. Die Angaben zur Beschreibung der SPT stammen aus USDA (2011) und Waltz (2012).

#### *3.11.7.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht*

Die SPT ist weniger ein Zuchtverfahren, als ein Verfahren, das die Produktion von Hybridsaatgut effizienter macht. Die Effizienz wird gesteigert, weil die bei der Herstellung von Hybridsaatgut oft notwendige Entfahmung der Mutterlinie wegfällt.

#### *3.11.7.3 Stand der Entwicklung*

In den USA kann die SPT bei Mais bereits praktiziert werden. Das US-Landwirtschaftsministerium hat 2011 die Erhaltungslinie DP-32138-1 für den Anbau freigegeben (Federal Register 2011). Bei Reis ist die SPT in Entwicklung (Pioneer 2012).

### **3.11.8 Virus-unterstützte Genexpression**

Die Virus-unterstützte Genexpression (VUGE) ist ein Verfahren, in dem pflanzenvirale Vektoren dazu benutzt werden, um in Pflanzen vorübergehend neu eingeführte Gene zu exprimieren. In der Pflanzenzüchtung wird das Verfahren seit neuem als Werkzeug eingesetzt, um Sorten zu züchten (Senthil-Kumar & Mysore 2011b), insbesondere im Zusammenhang mit der ZFN- und TALEN-Technik (Mahfouz & Li 2011, Vainstein et al. 2011, Marton et al. 2010; siehe Abschnitte 3.10, 3.11.1 und 3.11.2), sowie der Beschleunigten Züchtung (Yamagishi et al. 2011, Yamagishi & Yoshikawa 2011a/b); siehe Abschnitt 3.6).

Das Verfahren dürfte weitgehend identisch mit dem im Abschnitt 3.2 beschriebenen VIGS sein mit dem Unterschied, dass die viralen Vektoren bei der VUGE nicht RNAi-Konstrukte sondern Expressionskassetten besitzen.

### **3.11.9 Transformation mit Wildtyp *Agrobacterium rhizogenes***

Die Transformation mit Wildtyp *Agrobacterium rhizogenes* ist ein Züchtungsverfahren, das insbesondere im Zier- und Medizinalpflanzenbereich eingesetzt wird (z.B. Majumdar et al. 2011, Gangothyay et al. 2010, Christensen & Müller 2009a/b, Christensen et al. 2009/2008, Zhou et al. 2009, Saxena et al. 2007, Mishiba et al. 2006). Bei der Transformation werden die T-DNA und damit auch die *rol*-Gene der Agrobakterien ins Erbgut der Pflanze inseriert. Die Insertion dieser Gene kann den Phänotyp der regenerierten Pflanzen in einer gewünschten Art und Weise verändern und beispielsweise zu kompakt wachsenden Sorten führen. Inwieweit Sorten, die aus einer Transformation mit Wildtyp Agrobakterien hervorgehen, als GVO zu betrachten sind, ist diskutierbar, da der Prozess auch natürlicherweise auftritt (Debener & Winkelmann 2010, Christensen & Müller 2009b, Mishiba et al. 2006).

### 3.11.10 Methyltransferasen-Technik

Die Idee, mit synthetischen Methyltransferasen gezielt Epiallele in Pflanzen zu erzeugen, wird in der Literatur erst diskutiert. Konkrete Anwendungsbeispiele finden sich gegenwärtig nicht.

Synthetische Methyltransferasen, die eine gezielte Methylierung an einer vorbestimmten Sequenz im Erbgut ermöglichen können, lassen sich erzeugen, indem eine Methyltransferasen-Domäne mit einer DNA-Bindungsdomäne verknüpft wird. Gegenwärtig werden vor allem Zinkfinger als DNA-Bindungsdomänen erprobt. Die Funktionalität von synthetischen Methyltransferasen ist sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* gezeigt worden (Smith et al. 2008, Li et al. 2007, Minczuk et al. 2006, Carvin et al. 2003, McNamara et al. 2002, Xu & Bestor 1997).

Da neu erzeugte Methylierungsmuster stabil weiter vererbt werden können, wäre die Anwesenheit der Methyltransferasengene in den Pflanzen nur vorübergehend für die Erzeugung der Epiallele notwendig. Mit synthetischen Methyltransferasen liessen sich somit Sorten erzeugen, deren Erbgut frei von extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen ist.

## 4. Synopsis von Kapitel 3

In der Fachliteratur lassen sich mindestens zwanzig Pflanzenzuchtverfahren identifizieren, bei denen zu klären sein könnte, wie die daraus hervorgehenden Sorten rechtlich zu regulieren sind. Die zwanzig Verfahren sind in Tabelle 4 aufgelistet und kurz beschrieben. Die Auflistung trägt dabei willkürliche, detaillierende und vereinfachende Züge. Willkürlich ist teilweise die Namensgebung. Einige der Verfahren werden in der Literatur unterschiedlich bezeichnet, weshalb hinter den in dieser Arbeit verwendeten Namen eine Auswahl stehen kann. Für das in diesem Bericht Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese (ODM) genannten Verfahren beispielsweise existieren mehr als zehn verschiedene Namen (Lusser et al. 2011).

Detaillierend ist die Auflistung, weil sich einige der Verfahren auch gruppieren liessen. Ein Beispiel sind die Meganukleasen-Technik, die TALEN-Technik und die Zinkfinger-Nukleasen-Technik. Alle drei Verfahren basieren auf der Nutzung neuer Restriktionsenzyme (NRE), die vorbestimmte Sequenzen im Erbgut erkennen können und an diesen Stellen Doppelstrangbrüche in das Chromosom einführen. In der Literatur werden diese drei Verfahren teilweise zusammenfassend als NRE-Technik bezeichnet (Tzfira et al. 2012). Ein weiteres Beispiel sind das *Reverse Breeding* und die Zentromer-vermittelte Genomelimination, die beide dem *chromosome engineering* zugerechnet werden könnten (Chan 2010).

Vereinfachend ist die Auflistung, weil sie weitgehend unklar lässt, dass bei etlichen der zwanzig Verfahren mehrere verschiedene Ansätze möglich sind und entsprechend verschiedene Varianten unterschieden werden können. Die Namen der Verfahren sind in diesen Fällen als generische Begriffe aufzufassen. Ein Beispiel ist wiederum die ODM: Alle Varianten dieses Verfahrens beruhen zwar auf dem Einsatz synthetischer Oligos, der Typus der eingesetzten Oligos kann sich aber unterscheiden. Ein weiteres Beispiel sind die NRE-Techniken. Ihr gemeinsames Merkmal ist der Einsatz neuer Restriktionsenzyme. Abhängig davon, wie die Enzyme in die Zellen gebracht werden und ob sie alleine oder zusammen mit zusätzlichen genetischen Material eingeführt werden, sind in der Anwendung mehrere verschiedene Varianten vorstellbar.

Vereinfachend ist die Auflistung in Tabelle 4 des Weiteren, weil sie verbirgt, dass sich einzelne der Verfahren kombinieren lassen. Mögliche Kombinationen sind in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 4: Auflistung und Kurzbeschreibung der 20 in der Literatur identifizierten Verfahren, die einer rechtlichen Prüfung zu unterziehen sein könnten** (alphabetische Reihenfolge).

<b>Verfahren</b>	<b>Kurzbeschreibung</b>
Agroinfiltration	Nutzung von rekombinanten Agrobakterien, um in Geweben von Pflanzen eine vorübergehende Expression von Genen zu erreichen.
Beschleunigte Züchtung	Induktion einer Blühverfrühung, um die Kreuzungszüchtung zu beschleunigen.
Cisgenese	Transformation des Erbguts mit Genen, die von der gleichen Art oder von einer sexuell kompatiblen Art stammen und die in ihrer natürlichen Orientierung vorliegen, ihre eigenen Introns besitzen und von ihren nativen Promotoren und Terminatoren flankiert sind.
Gezielte chemische Mutagenese	Nutzung von an Oligonukleotide gekoppelten chemischen Mutagenen, um an einer vorbestimmten Stelle des Erbguts Mutationen auszulösen.
Gezielte Mutagenese mittels T-DNA	Nutzung von T-DNA, um ein endogenes Pflanzengen durch homologe Rekombination gezielt zu mutieren.
Induzierte Hypomethylierung	Senkung der Expression von DNA-Methyltransferasen oder anderer Regulatoren der DNA-Methylierung, um epiallelische Variation zu erzeugen.
Intragenese	Transformation des Erbguts mit DNA-Sequenzen, die von der gleichen Art oder von einer sexuell kompatiblen Art stammen.
Meganukleasen-Technik	Nutzung synthetischer Meganukleasen, um im Genom Gene gezielt auszuschalten, Gene gezielt zu korrigieren oder neue Gene an einem vorbestimmten Ort einzufügen.
Methyltransferasen-Technik	Nutzung synthetischer Methyltransferasen zur gezielten Methylierung genomischer Sequenzabschnitte.
Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese	Nutzung synthetischer Oligonukleotide, um an einer definierten Stelle des Erbguts spezifische Mutationen einzufügen.
Pfropfen	Herstellung von Chimären aus gentechnisch veränderten Wurzelstöcken und nicht gentechnisch veränderten Reisern.
Reverse Breeding	Herstellung homozygoter Elternlinien aus heterozygoten Pflanzen durch Unterdrückung der meiotischen Rekombination.
RNA-dirigierte DNA-Methylierung (RdDM)	Gezielte Methylierung genomischer Sequenzabschnitte mittels RNAi-Konstrukten.
Seed Production Technology	Nutzung transgener Erhaltungslinien, um männlich-sterile Mutterlinien zu vermehren, die in der Produktion von Hybridsaatgut eingesetzt werden können
TALEN-Technik	Nutzung synthetischer TALE-Nukleasen, um im Genom Gene gezielt auszuschalten, Gene gezielt zu korrigieren oder neue Gene an einem vorbestimmten Ort einzufügen.
Transformation mit Wildtyp Agrobakterien	Nutzung von Wildtyp <i>Agrobacterium rhizogenes</i> zur Herstellung von transformierten Pflanzen.
Virus-induziertes Gen-Silencing	Nutzung von rekombinanten Viren, um in Pflanzen eine vorübergehende Stilllegung von Genen zu erreichen.
Virus-unterstützte Genexpression	Nutzung von rekombinanten Viren, um in Pflanzen eine vorübergehende Expression von Genen zu erreichen.
Zentromer-vermittelte Genomelimination	Erzeugung haploider Pflanzen mittels gentechnisch veränderten Haploideninduktions-Linien.
Zinkfinger-Nukleasen-Technik	Nutzung synthetischer Zinkfinger-Nukleasen, um im Genom Gene gezielt auszuschalten, Gene gezielt zu korrigieren oder neue Gene an einem vorbestimmten Ort einzufügen.

Die in der Tabelle 4 aufgelisteten zwanzig Verfahren sind im Kapitel 3 einzeln behandelt worden. In den folgenden Abschnitten werden einige der dabei ermittelten Sachverhalte in einer Art Synopsis zusammenfassend aufgerollt. Als erstes werden die Verfahren in einer abstrahierenden Weise beschrieben, indem eine Kategorisierung nach Art der Anwendung und nach Zweck der Nutzung gentechnischer Methoden erfolgt (Abschnitt 4.1). Dann werden kurze Überblicke über den Stand der Entwicklung (4.2) sowie die Erkennung und Identifikation der Sorten aus den neuen Verfahren (4.3) gegeben. Schliesslich werden die Fragen und Aspekte resümiert, die bei der Sicherheitsbewertung (4.4) sowie der GVO-Klassierung der Sorten aus den neuen Verfahren (4.5) eine Rolle spielen könnten.

**Tabelle 5: Theoretisch mögliche Kombinierbarkeit der 20 identifizierten Verfahren** (ohne Anspruch auf Vollständigkeit).

<b>Verfahren</b>	<b>Theoretisch mögliche Kombinierbarkeit mit</b>
Agroinfiltration	Beschleunigte Züchtung, Reverse Breeding, RNA-dirigierte DNA-Methylierung
Beschleunigte Züchtung	Pfropfen, Virus-induziertes Gen-Silencing, Virus-unterstützte Genexpression
Cisgenese	Meganukleasen-, TALEN- und Zinkfinger-Nukleasen-Technik, Pfropfen
Gezielte chemische Mutagenese	----
Gezielte Mutagenese mittels T-DNA	----
Induzierte Hypomethylation	Virus-induziertes Gen-Silencing
Intragenese	Meganukleasen-, TALEN- und Zinkfinger-Nukleasen-Technik, Pfropfen
Meganukleasen-Technik	Cisgenese, Intragenese, Virus-unterstützte Genexpression
Methyltransferasen-Technik	Virus-unterstützte Genexpression
Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese	----
Pfropfen	Beschleunigte Züchtung, Cisgenese, Intragenese, Reverse Breeding, RNA-dirigierte DNA-Methylierung
Reverse Breeding	Pfropfen, Virus-induziertes Gen-Silencing, Zentromer-vermittelte Genomelimination
RNA-dirigierte DNA-Methylierung	Pfropfen, Virus-induziertes Gen-Silencing
Seed Production Technology	----
TALEN-Technik	Cisgenese, Intragenese, Virus-unterstützte Genexpression
Transformation mit Wt Agrobakterien	Pfropfen
Virus-induziertes Gen-Silencing	Beschleunigte Züchtung, Reverse Breeding, RNA-dirigierte DNA-Methylierung
Virus-unterstützte Genexpression	Beschleunigte Züchtung, Meganukleasen-, TALEN- und Zinkfinger-Nukleasen-Technik
Zentromer-vermittelte Genomelimination	Reverse Breeding
Zinkfinger-Nukleasen-Technik	Agroinfiltration, Cisgenese, Intragenese, Virus-unterstützte Genexpression

#### 4.1 Kategorisierung der neuen Pflanzenzuchtverfahren

Ein gemeinsames Merkmal der zwanzig identifizierten Verfahren ist, dass sie alle einen Schritt enthalten, in dem von aussen genetisches Material – sei es in Form von DNA oder RNA, sei es in der Länge von Oligonukleotiden oder in der Länge von Genen – in Pflanzenzellen eingeführt wird. Ein weiteres gemeinsames Merkmal ist, dass die Verfahren zwar auf gentechnischen oder Gentechnik-ähnlichen Methoden beruhen, diese Methoden aber auf eine ungewohnte Art und Weise nutzen. Bislang führte der Einsatz gentechnischer Methoden in der Pflanzenzüchtung zu Sorten mit den folgenden beiden Merkmalen: (I) Im Erbgut der Sorte ist von ausserhalb der Pflanze zugeführte DNA inseriert und (II) die neu inserierte DNA stammt ganz oder teilweise von artfremden Organismen. Bei neunzehn der zwanzig identifizierten Verfahren kann der Einsatz gentechnischer oder Gentechnik-ähnlicher Methoden hingegen in Sorten resultieren, die entweder nur das erste Merkmal (Insertion von ausserhalb zugefügter DNA) oder gar keines der beiden Merkmale aufweisen. Die gemeinsame Besonderheit dieser Verfahren ist somit: Sie nutzen zwar gentechnische oder Gentechnik-ähnliche Methoden, führen aber zu Sorten, die frei von artfremder DNA sein können. Eines der Verfahren – die Transformation mit Wildtyp Agrobakterien – führt zwar zu Sorten mit den beiden oben beschriebenen typischen Eigenschaften gentechnisch veränderter Sorten. Ungewohnt ist aber, dass das Verfahren nicht auf den klassischen Rekombinationstechniken beruht. Die zwanzig identifizierten Verfahren lassen sich aufgrund gemeinsamer Merkmale kategorisieren, wobei verschiedene Möglichkeiten der Einteilung bestehen. Lusser & Rodriguez-Cerezo (2012) beispielsweise teilen die Verfahren in folgende vier Gruppen ein: Cisgenese/Intragenese, Gezielte Mutagenese, *transgenic construct driven breeding* und Andere (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Einteilung der 20 identifizierten Verfahren in vier Gruppen gemäss Lusser & Rodriguez-Cerezo (2012).**

Gruppe	Verfahren
Gezielte Mutagenese	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gezielte chemische Mutagenese*</li> <li>• Gezielte Mutagenese mittels T-DNA*</li> <li>• Meganukleasen-Technik</li> <li>• Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese</li> <li>• TALEN-Technik*</li> <li>• Zinkfinger-Nukleasen-Technik</li> </ul>
Cisgenese/Intragenese	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cisgenese</li> <li>• Intragenese</li> </ul>
<i>Transgenic construct driven breeding</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beschleunigte Züchtung</li> <li>• Induzierte Hypomethylation*</li> <li>• Methyltransferasen-Technik*</li> <li>• Reverse Breeding</li> <li>• RNA-dirigierte DNA-Methylierung</li> <li>• Seed Production Technology*</li> <li>• Zentromer-vermittelte Genomelimination*</li> </ul>
Andere	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agroinfiltration</li> <li>• Pfropfen</li> <li>• Transformation mit Wildtyp Agrobakterien*</li> <li>• VIGS</li> <li>• VUGE</li> </ul>

\* Verfahren, die von Lusser & Rodriguez-Cerezo (2012) nicht behandelt worden sind und vom Autor den vier Klassen zugeteilt werden.

Schaart & Visser (2009) und Tait & Barker (2011) wiederum ordnen die Verfahren in vier Klassen: Gentechnik als Werkzeug zur Erleichterung der Züchtung, Pfropfen von nicht-GVO-Material auf GVO-Material, Gentechnik mit Material von der gleichen Art oder von sexuell-kompatiblen Arten sowie Gentechnik als Werkzeug zur Erzeugung spezifische Mutationen (siehe Tabelle 7).

**Tabelle 7: Einteilung von 16 der 20 identifizierten Verfahren in vier Klassen gemäss Schaart & Visser (2009) und Tait & Barker (2011).**

<b>Klasse</b>	<b>Verfahren</b>
<u>Klasse 1</u> : Gentechnik als Werkzeug zur Erleichterung der Züchtung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agroinfiltration</li> <li>• Beschleunigte Züchtung</li> <li>• Reverse Breeding</li> <li>• Seed Production Technology*</li> <li>• VIGS</li> <li>• VUGE*</li> <li>• Zentromer-vermittelte Genomelimination*</li> </ul>
<u>Klasse 2</u> : Pfropfen von nicht GVO-Material auf GVO-Material	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pfropfen</li> </ul>
<u>Klasse 3</u> : Gentechnische Veränderung mit Material von gleichen Art oder von sexuell-kompatiblen Arten	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cisgenese</li> <li>• Intragenese</li> </ul>
<u>Klasse 4</u> : Gentechnik als Werkzeug zur Erzeugung spezifischer Mutationen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gezielte chemische Mutagenese*</li> <li>• Gezielte Mutagenese mittels T-DNA*</li> <li>• Meganukleasen-Technik*</li> <li>• Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese</li> <li>• TALEN-Technik*</li> <li>• Zinkfinger-Nukleasen-Technik</li> </ul>

\* Verfahren, die von Schaart & Visser (2009) und Tait & Barker (2011) nicht behandelt worden sind und vom Autor den vier Klassen zugeteilt werden. Unklar ist, in welche Klasse die folgenden vier Verfahren zugeteilt werden würden: Induzierte Hypomethylation, Methyltransferasen-Technik, RNA-dirigierte DNA-Methylierung und Transformation mit Wildtyp Agrobakterien.

In den folgenden Abschnitten werden die zwanzig identifizierten Verfahren nach Art der Anwendung gentechnischer Methoden sowie nach Zweck der Nutzung gentechnischer Methoden kategorisiert. Die Kategorisierung nach Art der Anwendung gentechnischer Methoden dient als Basis für die Diskussion der Aspekte, die bei der GVO-Klassierung eine Rolle spielen (siehe Abschnitt 4.5). Die Kategorisierung nach Zweck der Nutzung wiederum resümiert die in Kapitel 3 für die einzelnen Verfahren dargestellten möglichen Anwendungen in der Pflanzenzucht.

#### **4.1.1 Kategorisierung nach der Art der Anwendung gentechnischer Methoden**

##### *4.1.1.1 Direkte Art der Anwendung gentechnischer Methoden*

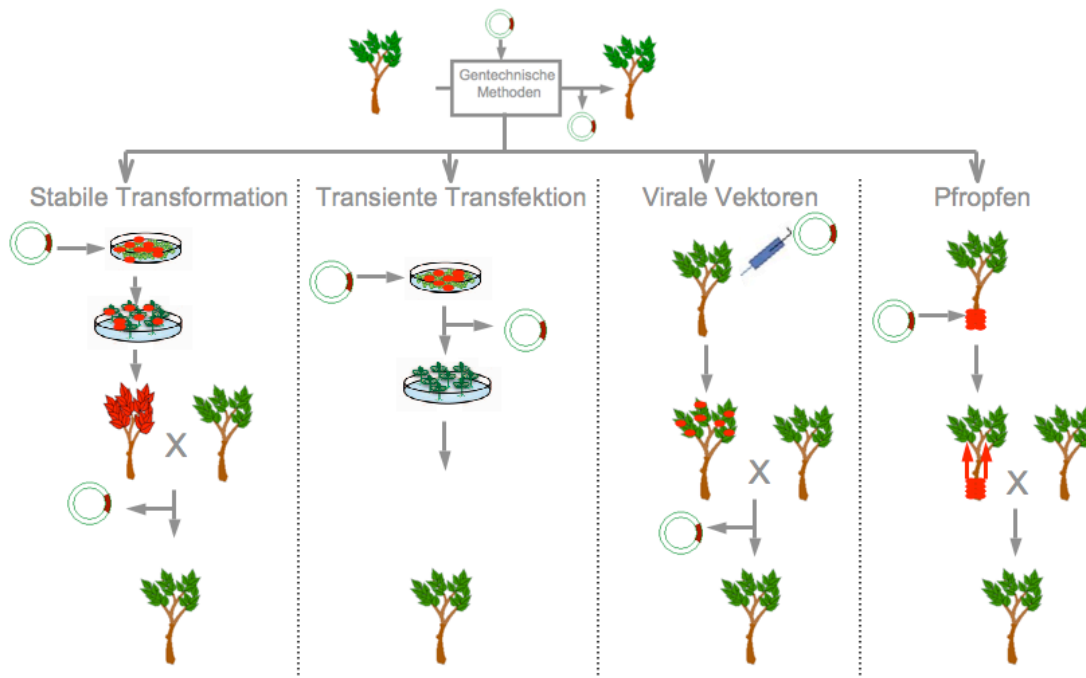
Das während eines Schrittes des Züchtungsverfahrens in Pflanzenzellen eingeführte genetische Material ist im Endprodukt – in der Sorte – stabil integriert im Erbgut vorhanden<sup>18</sup>. Das eingeführte genetische Material kann in der Sorte entweder als neues Allel oder als neues Gen vorliegen.

<sup>18</sup> Eine Ausnahme können Markergene sein, die eingeführt wurden, um erfolgreich transformierte Zellen selektionieren zu können. Marker-freie Nachkommen von stabil transformierten Pflanzen lassen sich heute mit verschiedenen Methoden erzeugen.



#### 4.1.1.2 Indirekte Art der Anwendung gentechnischer Methoden

Das während eines Schrittes des Züchtungsverfahrens in Pflanzenzellen eingefügte genetische Material ist im Endprodukt<sup>19</sup> *nicht mehr* vorhanden. Der Einsatz der gentechnischen Methoden dient hier dazu, eine bestimmte «Funktion» vorübergehend in Pflanzen oder Pflanzenzellen einzubringen. Da die eingebrachte «Funktion» im Endprodukt nicht mehr gebraucht wird, ist auch das ursprünglich eingefügte genetische Material nicht mehr notwendig. Je nach Verfahren können das genetische Material und somit auch die «Funktion» mit einer oder mehreren der folgenden vier aufgeführten Strategien eingebracht werden (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Vereinfachte Darstellung vier möglicher Strategien, mit denen sich genetisches Material und somit auch die gewünschte «Funktion» vorübergehend in Pflanzen, Pflanzenzellen oder Protoplasten einführen lassen. Nicht dargestellt ist die Strategie, das genetische Material via Agroinfiltration einzuführen. Bildquellen: Pflanzen stammen aus NTWG (2011), Petrischalen aus Mahfouz & Li (2011), Spritze aus Unver & Budack (2009), Plasmid von Magnus Manske, Wikipedia.

- **Stabile Transformation:** Das genetische Material wird in Pflanzenzellen eingeführt und dort stabil ins Erbgut integriert. Die beiden dafür am häufigsten eingesetzten Methoden sind die Biolistik (Partikelbombardement) und der Gentransfer mit Hilfe von Agrobakterien. Durch Segregation lassen sich während des weiteren Züchtungsprozesses aus den stabil transformierten Pflanzen Nachkommen gewinnen, die frei vom ursprünglich eingeführten genetischen Material sind.
- **Transiente Transfektion:** Das genetische Material wird vorübergehend in Protoplasten oder Zellsuspensionen eingeführt. Da das eingeführte genetische Material nicht stabil ins Erbgut integriert wird<sup>20</sup>, können aus den transfizierten Zellen oder Protoplasten Pflanzen regeneriert werden, die frei vom ursprünglich eingeführten genetischen Material sind.

<sup>19</sup> Das Endprodukt des Verfahrens kann hier entweder eine Sorte sein oder auch eine Pflanze, die für die weitere Züchtung verwendet hier.

<sup>20</sup> In Abhängigkeit der eingesetzten Methode kann es in einem kleinen Teil der transfizierten Zellen zur stabilen Transformation des Erbguts kommen. Würden diese Zellen im Züchtungsprozess weiter verwendet, könnte das inserierte genetische Material durch Auskreuzung wieder entfernt werden.

- *Einsatz pflanzenviraler Vektoren*: Das genetische Material wird mittels rekombinanter DNA- oder RNA-Viren vorübergehend in Pflanzen eingeschleust, ohne dass eine stabile Insertion ins Erbgut von Keimzellen stattfindet. Pflanzen ohne das eingeführte genetische Material können gewonnen werden, indem Virus-freie Nachkommen selektioniert werden<sup>21</sup>.

- *Einsatz stabil transformierter Wurzelstöcke*: Die in einem stabil transformierten Wurzelstock vorliegende «Funktion» wird in Form von Proteinen oder siRNAs in einen aufgepfropften Reiser transportiert. Da das genetische Material nicht in die Keimzellen des Reisers verfrachtet wird, sind die aus Samen und/oder Pollen gewonnenen Nachkommen des Reisers frei vom in den Wurzelstock eingeführten genetischen Material.

Neben den vier genannten Strategien wird in der Literatur vereinzelt auch diskutiert, die «Funktion» via Agroinfiltration in Pflanzen einzubringen. Werden dabei aus dem infiltrierten Gewebe Zellen gewonnen und *in vitro* zu ganzen Pflanzen regeneriert, können Nachkommen erzeugt werden, die frei von rekombinanten Agrobakterien und extrazellulär eingeführten Sequenzen sind.

#### 4.1.1.3 Kategorisierung nach Art der Anwendung gentechnischer Methoden

Tabelle 8 gibt für die zwanzig identifizierten Verfahren die Art der Anwendung gentechnischer Methoden wieder.

Zur Kategorie der Verfahren, die gentechnische Methoden auf eine direkte Art anwenden, werden hier folgende gezählt: Cisgenese, Gezielte Mutagenese mittels T-DNA, Intragenese, Transformation mit Wildtyp-Agrobakterien, Pfropfen sowie gewisse Varianten der drei NRE-Techniken (Tabelle 8). Mit der gezielten Mutagenese mittels DNA und gewissen NRE-Varianten werden somit auch Verfahren der Gruppe zugerechnet, bei denen es zwischen den eingeführten Sequenzen und endogenen Sequenzen zu einer homologen Rekombination kommt. Inwiefern eine homologe Rekombination einer materiellen Insertion gleichkommt oder eher ein Ablesen und Kopieren darstellt, ist diskutierbar.

Bei zwölf der zwanzig identifizierten Verfahren werden gentechnische Methoden immer auf eine indirekte Art angewendet. Bei den drei NRE-Techniken wiederum sind Varianten mit indirekter Nutzung möglich (Tabelle 8).

#### 4.1.2 Kategorisierung nach dem Zweck der Nutzung gentechnischer Methoden

Hinsichtlich des Zwecks der Nutzung gentechnischer Methoden lassen sich drei Kategorien ausmachen: die Nutzung zur Erzeugung genetischer Variation, die Nutzung zur Erzeugung epigenetischer Variation und die Nutzung als Mittel zur Unterstützung herkömmlicher Züchtungsverfahren. Tabelle 9 gibt die Zuordnung der zwanzig identifizierten Verfahren hinsichtlich des Zwecks der Nutzung gentechnischer Methoden wieder.

##### 4.1.2.1 Erzeugung genetischer Variation

Bei zehn der zwanzig identifizierten Verfahren besteht der Zweck darin, Pflanzen genetisch zu verändern. Die Art der beabsichtigten Veränderung ist dabei je nach Verfahren oder Verfahrensvarianten verschieden. Unterscheiden lassen sich der Transfer von Genen, der Austausch von Basen, die Erzeugung von Indels<sup>22</sup> sowie die Entfernung von Genen.

---

<sup>21</sup> Die Selektion kann mit unterschiedlichen Methoden erfolgen, wobei die Wahl der Methode davon abhängt, wie die verwendete Pflanze sich fortpflanzt und ob der eingesetzte Virus via Samen übertragen werden kann oder nicht. Bei vegetativ vermehrten Pflanzen kann die Elimination der Viren mit Techniken wie Thermo-therapie, Kryotherapie und Meristemkultur gelingen. Bei sexuell vermehrten Pflanzen können die Samen weiter verwendet werden, falls das eingesetzte Virus nicht oder nicht hundertprozentig via Samen übertragbar ist.

<sup>22</sup> Der Begriff «Indel» fasst Insertionen und Deletionen zusammen. Er wird hier für die Fälle verwendet, in denen mit den neuen Verfahren kurze Insertionen und/oder kurze Deletion im Erbgut erzeugt werden können.

**Tabelle 8: Art der Anwendung gentechnischer Methoden bei den 20 identifizierten Verfahren** (ohne Unterteilung in Varianten und ohne Berücksichtigung möglicher Kombinationen der Verfahren; in alphabetischer Reihenfolge).

Verfahren	Direkte Anwendung	Indirekt Anwendung
Agroinfiltration		A
Beschleunigte Züchtung		sT, vV, P
Cisgenese		
Gezielte chemische Mutagenese		tT
Gezielte Mutagenese mittels T-DNA		
Induzierte Hypomethylation		sT, vV
Intragenese		
Meganukleasen-Technik*		sT, tT, vV, A
Methyltransferasen-Technik		sT
Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese		tT
Pfropfen		
Reverse Breeding		sT, vV, P
RNA-dirigierte DNA-Methylierung		sT, tT, vV, P
Seed Production Technology		sT
TALEN-Technik*		sT, tT, vV, A
Transformation mit Wildtyp Agrobakterien		
Virus-induziertes Gen-Silencing		vV
Virus-unterstützte Genexpression		vV
Zentromer-vermittelte Genomelimination		sT
Zinkfinger-Nukleasen-Technik*		sT, tT, vV, A

Grau ausgefüllte Felder bedeuten, dass die Verfahren die Anwendungsart beinhalten. Bei den Verfahren, die eine indirekte Anwendung beinhalten, ist jeweils mit Abkürzungen angegeben, welche Strategien angewendet werden könnten, um das genetische Material und somit auch die «Funktion» vorübergehend in Pflanzenzellen, Protoplasten oder Pflanzen einzubringen. Die Abkürzungen bedeuten: A: Nutzung von Agrobakterien; P: Pfropfen eines Reisers auf einen gentechnisch veränderten Wurzelstock; sT: stabile Transformation; tT: transiente Transfektion; vV: Nutzung viraler Vektoren (VIGS und VUGE). Virale Vektoren können auch zusammen mit Agrobakterien eingesetzt werden.

\*: Die drei NRE-Techniken können je nach Variante der direkten oder indirekten Anwendungsart zugeordnet werden.

- **Gentransfer:** Durch eine direkte Anwendung gentechnischer Methoden werden ein oder mehrere neue exogene Gene stabil ins Erbgut von Pflanzen eingefügt. Dieser Transfer von Genen ist das Ziel bei der Cis- und Intragenese, bei Varianten der NRE-Techniken sowie beim Pfropfen. Im Vergleich zur bisher gewohnten Nutzung gentechnischer Methoden lassen sich folgende Unterschiede festmachen: Bei der Cis- und Intragenese sind die transferierten Gene nicht artfremden Ursprungs, sondern sie stammen von der gleichen Art oder von einer sexuell kompatiblen Art. Die NRE-Techniken wiederum machen es möglich, Gene gezielt an einem vorbestimmten Ort ins Erb-

gut einzufügen. Die eingefügten Gene können Trans-, Cis- oder Intragene sein. Beim Pfropfen schliesslich sind die transferierten Gene nicht im Erbgut aller Zellen der Pflanze vorhanden, sondern nur in den Zellen des Wurzelstocks. Ungewohnt ist letztendlich auch der Gentransfer bei der Transformation mit Wildtyp Agrobakterien, erfolgt hier doch der artenübergreifende Gentransfer ohne den Einsatz von Rekombinationstechniken.

- *Basenaustausch*: Der gezielte Austausch von Basen in einem endogenen Pflanzengen kann sowohl durch direkte als auch indirekte Anwendung gentechnischer Methoden erfolgen. Eine direkte Anwendung findet bei Varianten der NRE-Techniken und bei der gezielten Mutagenese mittels T-DNA statt. Hier werden neue Allele mit der gewünschten Basenabfolge in Pflanzenzellen eingeführt und stabil ins Erbgut inseriert (Allelaustausch via homologe Rekombination). Bei der Oligonukleotid-dirigierten Mutagenese erfolgt der Basenaustausch durch eine indirekte Anwendung: Pflanzenzellen werden mit synthetischen Oligos transfiziert, ohne dass es zu einer Insertion ins Erbgut kommt.
- *Indels*: Das Erzeugen von Indels an einem vorbestimmten Ort der Erbguts ist das Ziel bei Varianten der NRE-Techniken. Die Indels werden dabei in der Regel durch eine indirekte Anwendung gentechnischer Methoden erzeugt.
- *Gendeletion*: Das gezielte Entfernen von einem oder mehreren Genen aus dem Erbgut einer Pflanze kann mit Varianten der NRE-Techniken erfolgen und zwar durch eine indirekte Anwendung gentechnischer Methoden.

#### 4.1.2.2 Erzeugung epigenetischer Variation

Drei der zwanzig Verfahren wenden gentechnische Methoden auf indirekte Art an, um im Erbgut von Pflanzen so genannte Epiallele zu erzeugen. Epiallele sind Allele, die zwar in ihrer DNA-Sequenz übereinstimmen, aber unterschiedlich exprimiert sind. Die Erzeugung der Epiallele erfolgt bei allen drei neuen Verfahren durch eine Veränderung der DNA-Methylierung. Bei der Methyltransferasen-Technik und der RNA-dirigierten DNA-Methylierung findet eine gezielte Methylierung vorbestimmter genomischer Sequenzabschnitte statt. Beim Verfahren der induzierten Hypomethylierung wiederum ist der Eingriff ungezielt.

#### 4.1.2.3 Unterstützung herkömmlicher Züchtungsverfahren

Sieben der zwanzig Verfahren werden dazu benutzt, um herkömmliche Züchtungsverfahren zu unterstützen. Die Anwendung gentechnischer Methoden erfolgt dabei auf indirekte Art.

Die Agroinfiltration, VIGS und die VUGE können zur Selektion von Pflanzen mit gewünschten Eigenschaften eingesetzt werden. Eine genetische Veränderung der Pflanzen wird nicht beabsichtigt.

Die Beschleunigte Züchtung wird dazu eingesetzt, die Kreuzungszüchtung durch Induktion einer Blühverfrühung zeitlich abzukürzen. Die in den resultierenden Sorten absichtlich erzeugte genetische Variation ist das Resultat einer Kreuzung.

Das *Reverse Breeding* dient dazu, für ausgewählte heterozygote Pflanzen homozygote Elternlinien herzustellen, und erleichtert damit die Züchtung von Hybridsorten<sup>23</sup>. Bei der Erzeugung der Elternlinien werden keine genetischen Veränderungen beabsichtigt. Die bei der Züchtung der Hybridsorten absichtlich erzeugte genetische Variation ist das Resultat einer Kreuzung.

---

<sup>23</sup> Hybridsorten sind Sorten, die aus immer gleichen definierten Inzuchtlinien zusammengesetzt sind. Sie haben den Vorteil, über die genetisch unterschiedlichen Eltern mit einem breiteren Repertoire verschiedener genetischer Informationen ausgestattet zu sein, wodurch der genannte Heterosis-Effekt entsteht. Dieser Effekt lässt Pflanzen grösser und widerstandsfähiger werden.

**Tabelle 9: Zweck der Nutzung gentechnischer Methoden bei den 20 identifizierten Verfahren**  
(ohne Unterteilung in Varianten und ohne Berücksichtigung möglicher Kombinationen der Verfahren).

Verfahren	Zweck der Nutzung									
	Erzeugung von Variation						Hilfsmittel			
	genetisch				epi- genetisch		S	K	Hy	HA
Gt	Ba	In	Gd	g	z					
Agroinfiltration							■			
Beschleunigte Züchtung								■		
Cisgenese	■									
Gezielte chemische Mutagenese			■							
Gezielte Mutagenese mittels T-DNA		■								
Induzierte Hypomethylierung						■				
Intragenese	■									
Meganukleasen-Technik*	■	■	■	■						
Methyltransferasen-Technik					■					
Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese		■	■							
Pfropfen	■									
Reverse Breeding									■	
RNA-dirigierte DNA-Methylierung					■					
Seed Production Technology									■	
TALEN-Technik*	■	■	■	■						
Transformation mit Wt Agrobakterien	■									
Virus-induziertes Gen-Silencing							■			
Virus-unterstützte Genexpression							■			
Zentromer-vermittelte Genomelimination									■	■
Zinkfinger-Nukleasen-Technik*	■	■	■	■						

Grau ausgefüllte Felder bedeuten, dass die Verfahren den Nutzungszweck beinhalten. **Abkürzungen:** **Ba:** Gezielter Basenaustausch; **g:** gezielt; **Gt:** Gentransfer; **Gd:** gezielte Gendeletion; **Ha:** Verfahren unterstützt die Haploidenzüchtung; **Hy:** Verfahren unterstützt die Hybridzüchtung; **In:** gezielte Erzeugung von Indels; **K:** Verfahren unterstützt die Kreuzungszüchtung; **S:** Verfahren dient der Selektion. **Wt:** Wildtyp; **z:** zufällig.

Die *Seed Production Technology* ist keine eigentliche Züchtungsmethode, sondern vielmehr ein Verfahren, um die Vermehrung von Hybridsaatgut zu erleichtern. Das Verfahren nutzt gentechnisch veränderte Erhaltungs-Linien, um männlich-sterile Mutterlinien zu vermehren, die in der Pro-

duktion von Hybridsaatgut eingesetzt werden können. Im Endprodukt, dem Hybridsaatgut, sind die gentechnischen Veränderungen der Erhaltungs-Linie nicht mehr enthalten.

Das Verfahren der Zentromer-vermittelten Genomelimination unterstützt die Haploidenzüchtung<sup>24</sup>, indem es so genannte Haploideninduktionslinien bereitstellt. Der Zweck des Verfahrens ist eine Änderung der Ploidie<sup>25</sup>, eine genetische Veränderung wird nicht beabsichtigt.

## 4.2 Stand der Entwicklung der neuen Verfahren

Neue Pflanzenzuchtverfahren werden in der Grundlagenforschung, in der angewandten Forschung sowie in der Züchtungsforschung entwickelt und schliesslich in Züchtungsprogrammen privater Firmen oder öffentlicher Institutionen zur Herstellung neuer Sorten eingesetzt. Die Entwicklung lässt sich grob in folgende Schritte unterteilen: Formulierung des Konzepts, Nachweis der Machbarkeit an Modell- und Kulturpflanzenarten und Prüfung der Anwendbarkeit in Züchtungsprogrammen.

Wie häufig die zwanzig identifizierten Verfahren in Züchtungsprogrammen tatsächlich zur Anwendung kommen könnten, hängt von zahlreichen Faktoren ab und ist im vorliegenden Bericht für die einzelnen Verfahren nicht untersucht worden. Einer der Faktoren, der die Adoption der Verfahren beeinflussen wird, ist die GVO-Klassierung der aus den Verfahren hervorgehenden Sorten, beeinflusst sie doch die Höhe der Zulassungskosten und die Akzeptanz der Produkte in der Bevölkerung (Lusser et al. 2011).

In Tabelle 10 ist für die einzelnen der zwanzig identifizierten neuen Verfahren angegeben, ob sich in der Fachliteratur Veröffentlichungen zum Nachweis der Machbarkeit an Kulturpflanzenarten finden lassen, ob Anwendungen in Züchtungsprogrammen bekannt sind und ob in den kommenden fünf Jahren in der EU mit der Lancierung erster Sorten zu rechnen ist oder nicht. Die Angaben entsprechen einer Einschätzung und widerspiegeln die Resultate einer Literaturrecherche sowie die Ergebnisse einer vom *Joint Research Centre*<sup>26</sup> (JRC) im Jahr 2010 gemachten Umfrage bei Pflanzenzüchtungsfirmen (Lusser et al. 2011).

Inwieweit die zwanzig identifizierten Verfahren auch in der Schweiz angewandt werden, ist bisher nicht systematisch untersucht worden. Bekannt ist, dass Forschende hierzulande Agroinfiltration, VIGS, Cisgenese (Vanblaere et al. 2011, Szanowski et al. 2009) und Beschleunigte Züchtung (Le Roux et al. 2012, Flachowsky et al. 2011) anwenden beziehungsweise erproben.

## 4.3 Erkennung und Identifikation mit PCR-Methoden

Das Vorhandensein einer genetischen Veränderung in einer Pflanze lässt sich mit verschiedenen Methoden testen. Der Test kann auf Ebene der DNA, der Proteine wie auch der Metabolite erfolgen, wobei die DNA das ideale Zielmolekül ist, um genetische Veränderungen eindeutig erkennen und identifizieren zu können. Unter den DNA-basierten Testmethoden eignen sich wiederum PCR-Methoden am besten. Wie alle DNA-basierten Nachweisverfahren können PCR-Methoden jedoch nur dann zweckmässig angewandt werden, wenn zumindest minimale Informationen über die nachzuweisende DNA-Sequenz vorliegen.

---

<sup>24</sup> Bei der Haploidenzüchtung werden aus heterozygoten Kreuzungsnachkommen homozygote Inzuchtlinien hergestellt und zwar durch die Erzeugung von Doppelhaploiden.

<sup>25</sup> Ploidie bzw. Ploidiegrad ist die Zahl der in den Zellen eines Organismus vorhandenen Chromosomensätze.

<sup>26</sup> Das JRC ist eine Generaldirektion der EU-Kommission. Ihre Aufgabe ist es, wissenschaftlich-technische Unterstützung für die Konzeption, Entwicklung, Umsetzung und Überprüfung der EU-Politik zu leisten.

**Tabelle 10: Stand der Entwicklung der neuen Verfahren: Angaben zum Vorhandensein des Machbarkeitsnachweises an Kulturarten in der Fachliteratur und zu Anwendungen in Zuchtprogrammen sowie eine Einschätzung der Möglichkeit, dass erste Sorten in der EU bis 2017 auf den Markt kommen** (ohne Berücksichtigung von Varianten und Kombinationen).

<b>Verfahren</b>	<b>Machbarkeitsnachweis an Kulturarten in der Literatur vorhanden</b>	<b>Anwendungen in Zuchtprogrammen von Firmen oder öffentlichen Anstalten bekannt</b>	<b>Kommerzielle Lancierung von Sorten bis 2017 möglich*</b>
Agroinfiltration	ja	ja	ja
Beschleunigte Züchtung	ja	ja	eher nicht
Cisgenese	ja	ja	ja
Gezielte chemische Mutagenese	nein	nein	eher nicht
Gezielte Mutagenese via T-DNA	ja	nein	eher nicht
Induzierte Hypomethylierung	ja	nein	eher nicht
Intragenese	ja	ja	ja
Meganukleasen-Technik	ja	ja	ja
Methyltransferasen-Technik	nein	nein	eher nicht
Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese	ja	ja	ja
Pfropfen	ja	ja	ja
Reverse Breeding	nein	ja	eher nicht
RNA-dirigierte DNA-Methylierung	ja	ja	eher nicht
Seed Production Technology	nein	ja	ja**
TALEN-Technik	nein	nein	eher nicht
Transformation mit Wt Agrobakterien	ja	ja	ja
Virus-induziertes Gen-Silencing	ja	ja	ja
Virus-unterstützte Genexpression	ja	ja	ja
Zentromer-vermittelte Genomelimination	nein	nein	eher nicht
Zinkfinger-Nukleasen-Technik	ja	ja	ja

\*: Einschätzung für den Fall, dass die jeweiligen Sorten nicht als GVO klassiert werden. Im Falle einer GVO-Klassierung verzögert sich die Lancierung aufgrund der Bewilligungsverfahren. \*\*: In den USA ist 2011 die Maislinie DP-32138-1 für den Anbau bewilligt worden (Federal register 2011). Wt: Wildtyp.

Ob die aus den neuen Verfahren hervorgehenden Sorten mit PCR-Methoden erkenn- und identifizierbar sind, ist für die zwanzig neuen Verfahren im Einzelnen zu prüfen. Eine Erkennung der Sorten dürfte in all denjenigen Fällen möglich, in denen die neuen Verfahren zu einer Veränderung im genetischen Material der Sorte führen (genetische und epigenetische Variation) und Informationen zu dieser Veränderung vorliegen. Eine eindeutige Identifizierung der Sorten hingegen dürfte nur in den Fällen möglich sein, in denen die neuen Verfahren zu einem Gentransfer führen und Informationen zu den transferierten Sequenzen vorhanden sind. Ohne Vorwissen über die erzeugte

Veränderung im genetischen Material ist es kaum möglich, die Sorten mit PCR-Methoden als Produkt eines der neuen Verfahren zu identifizieren.

**Tabelle 11: Einschätzung der Erkenn- und Identifizierbarkeit von Sorten aus den 20 neuen Verfahren mit PCR-Methoden in Abhängigkeit davon, ob Vorwissen zur genetischen Veränderung in der Sorte vorliegt oder nicht** (ohne Berücksichtigung der Kombinierbarkeit der Verfahren).

Verfahren	Erkennung <sup>a</sup> ist möglich		Identifizierung <sup>b</sup> ist möglich	
	mit Vorwissen <sup>c</sup>	ohne Vorwissen <sup>d</sup>	mit Vorwissen <sup>c</sup>	ohne Vorwissen <sup>d</sup>
Agroinfiltration*	nein	nein	nein	nein
Beschleunigte Züchtung**	ja	nein	nein	nein
Cisgenese*	ja	nein <sup>e</sup>	ja	nein
Gezielte chemische Mutagenese**	ja	nein	nein	nein
Gezielte Mutagenese via T-DNA**	ja	nein	ja/nein <sup>f</sup>	nein
Induzierte Hypomethylation**	ja	nein	nein	nein
Intragenese*	ja	nein <sup>e</sup>	ja	nein
Meganukleasen-Technik**	ja	nein <sup>e</sup>	ja/nein <sup>f</sup>	nein
Methyltransferasen-Technik**	ja	nein	nein	nein
Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese*	ja	nein	nein	nein
Pfropfen* <sup>g</sup>	nein	nein	nein	nein
Reverse Breeding*	nein	nein	nein	nein
RNA-dirigierte DNA-Methylierung*	ja	nein	nein	nein
Seed Production Technology** <sup>h</sup>	nein	nein	nein	nein
TALEN-Technik**	ja	nein <sup>e</sup>	ja/nein <sup>f</sup>	nein
Transformation mit Wt Agrobakterien**	ja	nein <sup>e</sup>	ja	nein
Virus-induziertes Gen-Silencing**	nein	nein	nein	nein
Virus-unterstützte Genexpression**	nein	nein	nein	nein
Zentromer-vermittelte Genomelimination*	nein	nein	nein	nein
Zinkfinger-Nukleasen-Technik*	ja	nein <sup>e</sup>	ja/nein <sup>f</sup>	nein

\*: Angaben entsprechen der Meinung von Mitgliedern des ENGL (siehe Haupttext); \*\*: Angaben beruhen auf einer ersten Einschätzung und sind durch Fachleute zu überprüfen.

**a:** Mit Erkennung ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material eines Organismus festzustellen und zwar in Bezug auf einen geeigneten Komparator; **b:** Mit Identifizierung ist die Möglichkeit gemeint, die Existenz einer Veränderung im genetischen Material als Veränderung zu erkennen, die absichtlich durch ein bestimmtes Verfahren eingeführt worden ist.; **c:** Mit Vorwissen bedeutet, dass Informationen zur genetischen Veränderung vorliegen; **d:** Ohne Vorwissen bedeutet, dass keine Informationen zur genetischen Veränderungen vorliegen; **e:** Situation ist fallweise vergleichbar mit der bereits heute bestehenden Herausforderung, unbekannte GVO nachzuweisen; **f:** Möglichkeit der Identifizierung ist abhängig davon, welche Variante des Verfahrens durchgeführt wird und/oder in welchem Umfang an einem einzelnen Locus genetische Veränderungen eingeführt worden sind; **g:** Die Angaben gelten für den Reiser einer Chimären aus einem gentechnisch veränderten Wurzelstock und einem nicht gentechnisch veränderten Reiser; **h:** Die Angaben gelten für das aus dem Verfahren resultierende Hybridsaatgut.



Eine Einschätzung zur Erkennbar- und Identifizierbarkeit von Sorten aus den zwanzig identifizierten Verfahren mittels PCR-Methoden ist in Tabelle 11 wiedergegeben. Bei sechs der zwanzig Verfahren widerspiegelt die Einschätzung die Meinung von Mitgliedern des *European Network of GMO Laboratories* (ENGL)<sup>27</sup>, die im Auftrag des JRC acht der neuen Verfahren unter die Lupe genommen haben (Lusser et al. 2011). Bei den restlichen Verfahren beruht die Einschätzung auf der Meinung des Autors, weshalb sie von Fachleuten zu überprüfen ist. Wie aus den Angaben der Tabelle 11 hervorgeht, dürfte es bei der Mehrheit der Verfahren nicht möglich sein, die resultierenden Sorten mit PCR-Methoden eindeutig als Produkt des Verfahrens zu erkennen und somit klar von herkömmlich gezüchteten Sorten zu unterscheiden. Inwiefern in diesen Fällen andere Nachweismethoden oder eine Kombination von Methoden für die Erkennung und Identifikation verfügbar sind oder entwickelt werden könnten, bleibt zu prüfen (Broeders et al. 2012).

#### **4.4 Sicherheitsaspekte**

Ob eine neu gezüchtete Sorte unbeabsichtigte Eigenschaften aufweist, welche in unerwünschter Weise auf Mensch, Tier oder Umwelt einwirken könnten, hängt von ihrem Phänotyp ab und kann nur von Fall zu Fall beurteilt werden. Ob eine neu gezüchtete Sorten wiederum ein Risiko für Mensch, Tier und Umwelt darstellt, hängt nicht allein von den Eigenschaften einer Sorte ab, sondern auch von Expositionsfaktoren wie zum Beispiel dem Ausmass, mit welchem eine Sorte angebaut wird, oder der Konsummenge. Ob ein etwaiges Risiko schliesslich als tragbar eingestuft wird oder nicht, hängt von gesellschaftlichen Wertvorstellungen und den Schutzziele ab.

Wie die Sicherheit von Sorten aus den neuen Verfahren zu beurteilen ist, wird in der Literatur von verschiedenen AutorInnen diskutiert. In Tabelle 12 finden sich Funde von Berichten und Veröffentlichungen, in denen die Sicherheit der neuen Verfahren ein Thema ist. Da bei der Mehrheit der neuen Verfahren keine konkreten Daten zur Sicherheit einzelner neuer Phänotypen vorliegen, fällt der Fokus der Diskussionen meistens auf die Frage, wie die Sicherheit im Vergleich zu herkömmlichen Zuchtverfahren und zur Transgenese einzustufen ist. Ein zentraler Aspekt dieser Diskussion ist das mögliche Auftreten von unbeabsichtigten Wirkungen. Bisher wenig diskutiert wird die bei Verfahren mit indirekter Anwendung gentechnischer Methoden auftretende Frage, wie zuverlässig sich die Abwesenheit extrazellulär eingeführter Sequenzen nachweisen lässt.

##### **4.4.1 Unbeabsichtigte Wirkungen**

In Kapitel 3 sind für neun der zwanzig identifizierten Verfahren jeweils Aspekte aufgeführt, die bei der Bewertung der Sicherheit der einzelnen Verfahren beziehungsweise der jeweils daraus hervorgehenden Sorten eine Rolle spielen könnten. Der Blick, der dabei auf die Verfahren geworfen wird, ist Prozess-bezogen: Für die einzelnen Verfahren wird auf eine von konkreten Eigenschaften abstrahierende Weise dargestellt, ob und wie der jeweilige Züchtungsprozess in den resultierenden Sorten zu unbeabsichtigten Wirkungen führen kann. Unbeabsichtigte Wirkungen können neutral, erwünscht oder unerwünscht sein. Da sie in Sorten auch Eigenschaften auslösen können, welche in unerwünschter Weise auf Mensch, Tier und Umwelt einwirken könnten, ist die Identifizierung möglicher Prozesse, die zu unbeabsichtigten Wirkungen führen können, ein Schritt, um die Sicherheit eines Verfahrens bewerten zu können.

---

<sup>27</sup> Das ENGL ist eine von der EU-Kommission eingerichtete ExpertInnengruppe, die das Ziel verfolgt, GVO-Nachweisverfahren zu harmonisieren und zu standardisieren. Zudem unterstützt das ENGL auch das am JRC eingerichtete GVO-Referenzlabor der EU.

Unbeabsichtigte Wirkungen können durch verschiedenste Prozesse ausgelöst werden und treten bei allen Züchtungsverfahren auf. Einzelne Züchtungsverfahren können sich dabei in der Art der Prozesse unterscheiden. Für die ausgewählten neuen Verfahren wird in Kapitel 3 jeweils dargestellt, ob die identifizierten Prozesse auch bei anderen Züchtungsverfahren vorkommen. Damit lässt sich beantworten, ob die Prozesse spezifisch für das jeweilige Verfahren sind oder nicht, und es wird eine erste Basis gelegt, um die neuen Verfahren mit anderen Verfahren zu vergleichen.

**Tabelle 12: Funde von Veröffentlichungen, in denen Sicherheitsaspekte der neuen Verfahren diskutiert werden** (ohne Anspruch auf Vollständigkeit).

Verfahren	Literaturfunde zu Sicherheitsaspekten
Agroinfiltration	Lusser et al. 2011, Schaart & Visser 2009, COGEM 2006a
Beschleunigte Züchtung	Schaart & Visser 2009
Cisgenese	EFSA 2012a, Lusser et al. 2011, Prins & Kok 2010, Jacobsen & Schouten 2009/2008/2007, Schaart & Visser 2009, Kok et al. 2008, Russel & Sparrow 2008, COGEM 2006b, De Cock Buning et al. 2006, Giddings 2006, Myskja 2006, Schouten et al. 2006a/b/c, Schubert & Williams 2006, Krens 2005
Gezielte chemische Mutagenese	----
Gezielte Mutagenese mittels T-DNA	----
Induzierte Hypomethylation	----
Intragenese	Lusser et al. 2011, Schaart & Visser 2009, Russel & Sparrow 2008, Rommens 2007, Rommens et al. 2007
Meganukleasen-Technik	EFSA 2012b*
Methyltransferasen-Technik	----
Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese	Lusser et al. 2011, Breyer et al. 2009, Schaart & Visser 2009, COGEM 2006a,
Pfropfen	Hemmer et al. 2009, Schaart & Visser 2009, Youk et al. 2009, COGEM 2006a, Yi et al. 2006, Vigne et al. 2004
Reverse Breeding	Lusser et al. 2011, Schaart & Visser 2009, COGEM 2006a
RNA-dirigierte DNA-Methylierung	Lusser et al. 2011, COGEM 2006a
Seed Production Technology	USDA 2011
TALEN-Technik	EFSA 2012b*
Transformation mit Wildtyp Agrobakterien	----
Virus-induziertes Gen-Silencing	Schaart & Visser 2009, HSE 2005, Robertson 2004
Virus-unterstützte Genexpression	Tourino et al. 2008, HSE 2007/2005
Zentromer-vermittelte Genomelimination	----
Zinkfinger-Nukleasen-Technik	EFSA 2012b*,Lusser et al. 2011, COGEM 2009a

\*: Diskussion derjenigen Variante der NRE-Verfahren, die zur Insertion neuer Gene führt.

Um auf eine vergleichende Art und Weise die Sicherheit der neuen Verfahren beurteilen zu können, dürfte es notwendig sein, auch die Anzahl der möglicherweise beteiligten Prozesse, die Häufigkeit mit der die einzelnen Prozesse eintreten sowie die Schwere der jeweils möglichen Folgen in den Vergleich mit einzubeziehen. Ob dieses Vorgehen möglich ist, bleibt zu klären.

Ob in einer Sorte, die kommerzialisiert werden soll, unerwünschte Wirkungen auftreten, hängt nicht allein von den Prozessen ab, die während der Züchtung zu unbeabsichtigten Wirkungen führen können, sondern auch von den AnwenderInnen und somit von ihrem Wissen, ihrer Erfahrung und ihrer Sorgfalt.

ZüchterInnen nehmen auf verschiedene Weise Einfluss auf das Auftreten unbeabsichtigter Wirkungen. Bei Verfahren beispielsweise, die eine Transformation beinhalten, können sie durch das Design des genetischen Konstruktes, die Wahl der Transformationsmethode sowie die Auswahl der Primärtransformanten beeinflussen, in welchem Umfang unbeabsichtigte Wirkungen eintreten. Unabhängig vom jeweiligen Züchtungsverfahren dürfte die Selektion von Sortenkandidaten der wichtigste Schritt sein, um Pflanzen mit unerwünschten Wirkungen auszusortieren. Da aus allen Züchtungsverfahren Sorten hervorgehen können, die unbeabsichtigte und unerwartete Effekte haben, werden neu gezüchtete Sorten routinemässig in einem Selektionsprozess auf unerwünschte Wirkungen überprüft. Welche Merkmale und Eigenschaften einer Sorte dabei mit welchen Methoden wie genau untersucht werden, hängt einerseits von der jeweiligen Pflanzenart und der Sorgfalt der ZüchterInnen ab. Andererseits kann hier auch der Staat Einfluss nehmen, indem er Vorgaben macht oder Vorschriften erlässt, wie die Selektion und somit die Prüfung neuer Sorten durchgeführt werden soll.

Wie der Selektionsprozess Einfluss auf die Sicherheit der Sorten aus den neuen Verfahren nehmen kann, ist im vorliegenden Bericht teilweise erwähnt, aber nicht systematisch untersucht worden.

#### **4.4.2 Nachweis der Abwesenheit extrazellulär eingeführter Sequenzen**

Bei Verfahren, die gentechnische Methoden auf indirekte Art anwenden (Abschnitt 4.1.1.2), sollen als Endprodukt Sorten entstehen, die frei von den während des Prozesses von aussen eingeführten Sequenzen sind. Bevor solche Sorten versuchsweise in die Umwelt freigesetzt oder in Verkehr gebracht wird, sollte vorsorglich nachgewiesen werden, dass sie komplett frei vom eingeführten genetischen Material sind (Schaart & Visser 2009). Um diesen Nachweis zu erbringen, stehen verschiedene Methoden wie PCR und Southern-Blot zur Verfügung. Mit welcher Zuverlässigkeit sich mit den verfügbaren Methoden der Nachweis erbringen lässt, wird hier nicht untersucht, weshalb die Frage abzuklären bleibt.

Wie in Abschnitt 4.1.1.2 dargestellt, können bei der indirekten Anwendung gentechnischer Methoden unterschiedliche Strategien verfolgt werden, um das genetische Material vorübergehend in Pflanzen oder Pflanzenzellen einzubringen. Je nach angewandter Strategie erfolgt die «Entfernung» des eingeführten genetischen Materials auf unterschiedliche Weise. Wie zuverlässig sich dabei jeweils das eingeführte genetische Material entfernen lässt, wird hier nicht untersucht, weshalb die Frage abzuklären bleibt. Je nach angewandter Strategie ist zudem der Nachweis der Abwesenheit des extrazellulär eingeführten genetischen Materials unterschiedlich zu führen. Im Folgenden wird eine Einschätzung gegeben, welche Sequenzen jeweils berücksichtigt werden sollten; der genaue Sachverhalt bleibt abzuklären.

Transformation: Bei der Transformation werden von aussen eingeführte Sequenzen stabil ins Erbgut einer Pflanze inseriert. Neben der gewünschten Insertion können – in Abhängigkeit der eingesetzten Transformationsmethode – weitere Sequenzen ins Erbgut der Pflanze integriert werden. Diese «überflüssigen» Sequenzen können dabei mit dem gewünschten Insert verlinkt oder sein oder nicht. Bei Nachkommen transformierter Pflanzen könnte es somit nicht nur notwendig sein, die Abwesenheit aller intakten Kopien des inserierten Transgens nachzuweisen, sondern auch das Fehlen weiterer Sequenzen zu bestätigen. Dazu können gehören: Sequenzen aus dem Rückgrat

des Vektors (Gelvin 2003), Sequenzen aus der chromosomalen DNA von Agrobakterien (Ülker et al. 2008), sowie Sequenzen unvollständig inserierter Transgene.

Transiente Transfektion: Bei der transienten Transfektion werden definierte Sequenzen vorübergehend in Zellsuspensionen oder Protoplasten eingeführt. Eine Insertion dieser Sequenzen ins Erbgut der Pflanze ist nicht beabsichtigt, kann aber je nach Transfektionsverfahren nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Regenerierte Pflanzen oder deren Nachkommen sollten auf die Abwesenheit der eingeführten Sequenzen getestet werden.

Pfropfen: Aufgrund der verfügbaren Daten wird davon ausgegangen, dass ein Transfer von genetischem Material aus dem Erbgut eines Wurzelstockes in den Reiser unwahrscheinlich ist (Haroldsen et al. 2012a, Lusser et al. 2011, Schaart & Visser 2009, COGEM 2006a). Damit könnte die Notwendigkeit entfallen, Nachkommen des Reises auf die Abwesenheit der im Erbgut des Wurzelstocks neu inserierten Sequenzen zu testen.

Einsatz viraler Vektoren: Bei VIGS und VUGE werden definierte Sequenzen vorübergehend in Pflanzen eingeführt. Eine Insertion dieser Sequenzen ins Erbgut der Pflanze ist nicht beabsichtigt, kann aber – insbesondere wenn die viralen Vektoren via Agroinokulation oder Agroinfektion eingeschleust werden – nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Nachkommen von Pflanzen, die mit viralen Vektoren behandelt worden sind, sollten deshalb auf die Abwesenheit rekombinanter Viren und Vektorsequenzen getestet werden (Schaart & Visser 2009). Falls virale Vektoren via Agroinokulation oder Agroinfektion in Pflanzen eingebracht werden, sind die Nachkommen der behandelten Pflanzen zusätzlich auf die Abwesenheit rekombinanter Bakterien, chromosomaler DNA der Agrobakterien sowie von T-DNA-Sequenzen zu testen (Schaart & Visser 2009).

Agroinfiltration: Bei der Agroinfiltration werden definierte Sequenzen mit Hilfe von Agrobakterien vorübergehend in Pflanzen eingeführt. Eine Insertion dieser Sequenzen ins Erbgut der Pflanze ist zwar nicht beabsichtigt, sie kann aber vorkommen. Nachkommen agroinfiltrierter Pflanzen sollten auf die Abwesenheit von rekombinanten Bakterien, von chromosomaler DNA der Agrobakterien sowie von T-DNA-Sequenzen getestet werden (Schaart & Visser 2009). Im Falle der Agroinokulation und Agroinfektion sind die Nachkommen zudem auf die Abwesenheit rekombinanter Viren zu testen (siehe oben).

## **4.5 Aspekte der GVO-Klassierung**

Ob die aus den zwanzig beschriebenen Verfahren hervorgehenden Sorten nach geltendem Recht als GVO zu klassieren sind oder nicht, wird für jedes Verfahren unter Berücksichtigung möglicher Varianten und Kombinationen einzeln zu prüfen sein. Für neun der beschriebenen Verfahren sind in Kapitel 3 jeweils Aspekte diskutiert worden, die bei der GVO-Klassierung der Sorten aus den Verfahren eine Rolle spielen könnten. Im Folgenden werden diese Aspekte resümiert und zwar im Zusammenhang mit der Art der Anwendung gentechnischer Methoden (siehe Abschnitt 4.1.).

### **4.5.1 Direkte Art der Anwendung gentechnischer Methoden**

Organismen, die von aussen eingeführtes genetisches Material stabil in ihr Erbgut integriert haben, werden nach geltendem Recht in der Regel als GVO klassiert. Eine Ausnahme von dieser Regel sind nicht pathogene Organismen, die aus dem Verfahren der Selbstklonierung entstehen (Anh. 1 Abs. 3 FrSV)<sup>28</sup>.

---

<sup>28</sup> Die Schweizer Gesetzgebung weicht bei der Regulierung der Selbstklonierung von der EU-Gesetzgebung ab: In der EU werden selbstklonierte Organismen bei Freisetzungsversuchen und beim Inverkehrbringen wie GVO reguliert, in der Schweiz hingegen wie nicht-GVO.

Neue Verfahren wie die Cisgenese und Varianten der NRE-Technik können den Kriterien der Selbstklonierung entsprechen, weshalb sich die Frage stellt, ob die aus diesen Verfahren hervorgehenden Sorten in bestimmten Fällen aus dem Geltungsbereich des GTG fallen können oder nicht?

Eine ähnliche Situation findet sich bei der gezielten Mutagenese mittels T-DNA sowie Varianten der NRE-Technik: Hier ist das von aussen zugeführte genetische Material im Erbgut der resultierenden Sorten zwar vorhanden, es führt aber nicht zur Insertion eines neuen Gens sondern zu einem Allelaustausch. Die resultierende Veränderung am genetischen Material ist somit der Austausch von einer oder mehreren Basen. Da diese Veränderung auch spontan erfolgen oder durch das nicht gentechnische Verfahren der Mutagenese erzeugt werden kann, ist zu klären, was für die GVO-Klassierung entscheidend sein soll: Ist es der Aspekt der Insertion von Nukleinsäuren ins Erbgut des Organismus? Oder ist es der Aspekt, dass die Veränderungen am genetischen Material Mutationen sind? Zu klären könnte dabei auch die Frage sein, ob die Anzahl der in einer bestimmten endogenen Sequenz ausgetauschten Basen entscheidend für die GVO-Klassierung sein kann oder nicht?

Beim Pfropfen ist zu klären, ob Nachkommen eines Reisers, der auf einen gentechnisch veränderten Wurzelstock gepfropft wurde, als GVO zu klassieren sind oder nicht.

Beim Verfahren der Transformation mit Wildtyp Agrobakterien entstehen zwar Sorten, die artfremde Gene in ihrem Erbgut aufweisen, da aber die Kriterien von Anhang 1 Abs. 1 Bst. a und b nicht erfüllt sein dürften, bleibt zu klären, ob es sich um ein gentechnisches Verfahren im Sinne der FrSV handelt oder nicht.

#### **4.5.2 Indirekte Art der Anwendung gentechnischer Methoden**

Werden gentechnische Methoden auf eine indirekte Art angewendet, können aus den Verfahren Sorten hervorgehen, die frei von extrazellulär eingeführtem genetischem Material sind (siehe Abschnitt 4.1.1.2). Ob solche Sorten nach geltendem Recht als GVO gelten können oder nicht, ist sowohl aus einer Prozess-bezogenen als auch einer Produkt-bezogenen Perspektive zu betrachten sowie in Hinsicht auf Anhang 1 Absatz 3 FrSV zu prüfen. In Abhängigkeit von den im Abschnitt 2.2 dargestellten vier möglichen indirekten Anwendungen gentechnischer Methoden stellen sich dabei konkret folgende fünf Fragen:

(I) Gelten Kreuzungsnachkommen einer stabil transformierten Pflanze als GVO, wenn sie frei vom ursprünglich transformierten genetischen Material sind? (II) Gelten Nachkommen von Pflanzen, die sich aus transfizierten Zellen regeneriert haben, als GVO, wenn sie das ursprünglich transfizierte genetische Material nicht mehr enthalten? (III) Gelten Nachkommen von Pflanzen, die in etlichen ihrer Zellen rekombinante Viren enthielten, als GVO, wenn sie frei vom rekombinanten Virus sind? (IV) Gelten Nachkommen eines Reisers, der auf einen stabil transformierten Wurzelstock gepfropft ist, als GVO? (V) Spielt es bei der Beantwortung der ersten vier Fragen eine Rolle, ob die Nachkommen andere Veränderungen als Insertionen extrazellulärer Nukleinsäuren in ihrem genetischen Material aufweisen, die auf die Anwendung gentechnischer Methoden zurückgehen? Weder GTG noch FrSV geben auf diese Fragen eine explizite Antwort<sup>29</sup>.

Aus einer streng Prozess-bezogenen Perspektive kann argumentiert werden, dass es im Sinne des

---

<sup>29</sup> Ausserhalb der Gentechnikgesetzgebung finden sich zumindest für die Frage (I) Antworten. Artikel 9a Absatz 2 Vermehrungsmaterial-Verordnung hält dazu folgendes fest: Wird eine gentechnisch veränderte Sorte zur Züchtung verwendet, so gelten die davon abstammenden Sorten ebenfalls als gentechnisch verändert, ausser wenn nachgewiesen ist, dass sie die gentechnische Veränderung nicht mehr enthalten. In Artikel 2 Buchstabe d der Verordnung der EDI über gentechnisch veränderte Lebensmittel (VGVL) steht, dass Organismen, die aus einer Kreuzung von GVO mit einem anderen Organismus hervorgehen, als GVO gelten. Ein Bezug auf das Vorhandensein der gentechnischen Veränderung wird hier nicht genommen.

verfahrenbasierten Konzeptes der Gentechnikgesetzgebung sei, Pflanzensorten immer dann als GVO zu klassieren, wenn bei ihrer Züchtung gentechnische Methoden angewendet werden. Die Fragen (I) bis (IV) wären in diesem Sinn immer zu bejahen und Frage (V) zu verneinen. Da nach GVO-Legaldefinition jedoch nur solche Sorten als GVO klassiert werden können, die eine Veränderung an ihrem genetischen Material aufweisen, dürfte die streng Prozess-bezogene Argumentation nicht zutreffen. Aus einer weniger streng Prozess-bezogenen Perspektive lässt sich argumentieren, dass Frage (V) zu bejahen ist und deshalb die Fragen (I) bis (IV) immer dann auch bejaht werden können, wenn irgendeine Veränderung am genetischen Material vorliegt, die auf eine gentechnische und somit natürlicherweise nicht vorkommende Methode zurückgeht.

Aus einer Produkt-bezogenen Perspektive lässt sich argumentieren, dass eine Anwendung gentechnischer Methoden dann aufhört der regulative Bezugspunkt zu sein, wenn sie im Endprodukt zu einer Veränderung am genetischen Material führt, die auch natürlicherweise vorkommen kann. Die Frage (V) wäre zu bejahen und in Hinsicht auf die Beantwortung der Fragen (I) bis (IV) gälte es im Einzelnen zu prüfen, ob die mit den neuen Verfahren am genetischen Material erzeugbaren Veränderungen auch natürlicherweise vorkommen können oder nicht.

Ob die aus einer indirekten Art der Anwendung gentechnischer Methoden hervorgehenden Sorten als GVO gelten können, ist auch in Hinsicht auf Anhang 1 Absatz 3 FrSV zu prüfen. Dort sind diejenigen Verfahren aufgeführt, die in der Regel nicht zu GVO führen. Dazu gehören unter anderem die Mutagenese und Verfahren, die zu einer Änderung der Ploidie führen. Indem die FrSV diese Verfahren als nicht gentechnische deklariert, konkretisiert sie gleichzeitig, welche Änderungen am genetischen Material im Sinne der Gentechnikgesetzgebung als nicht gentechnische Veränderungen gelten können. Dazu gehören die mit einigen der neuen Verfahren erzeugbaren Basenaustauschmutationen, Indels, Gendeletionen und Haploidisierungen. Nach Anhang 1 Absatz 3 FrSV gilt nun jedoch auch, dass die genannten Veränderungen dann zu einem GVO führen, wenn die entsprechenden Verfahren «mit dem Einsatz von rekombinanten Nukleinsäuremolekülen oder von GVO verbunden sind». Wie dies ausgelegt werden könnte, wird im Folgenden an einem Beispiel diskutiert.

Bei gewissen Varianten der NRE-Techniken werden Restriktionsenzyme als Gene, also in Form von DNA, in die Pflanzen eingeführt. In der Zelle werden die Gene exprimiert, die entstehenden Restriktionsenzyme schneiden das Erbgut an der vorbestimmten Stelle entzwei und die Zelle repariert die Bruchstelle, wodurch dort Indels entstehen. Das Einführen der Gene kann dabei mit stabiler Transformation, mit transienter Transfektion oder mit pflanzenviralen Vektoren erfolgen. Bei der stabilen Transformation entsteht zu Beginn des Verfahrens ein GVO. Ist das Verfahren somit im Sinne der FrSV «mit dem Einsatz von GVO» verbunden und die resultierende Sorte als GVO zu klassieren, auch wenn sie die ursprünglich eingesetzten Gene nicht mehr besitzt? Gemäss dem erläuternden Bericht zur FrSV (EDI 1997) kann der Ausdruck «mit dem Einsatz von GVO verbunden» so verstanden werden, dass der Organismus bei Beginn des Verfahrens gentechnisch verändert ist. Diese Auslegung könnte für den Fall, dass die Gene der Restriktionsenzyme mittels stabiler Transformation eingebracht werden zutreffen. Wie sieht dies für den Fall aus, in dem die Gene via transiente Transfektion eingeführt werden? Hier stellt sich die Frage, ob Pflanzen, die aus transfizierten Zellen regenerieren, rechtlich als GVO gelten. Gelten sie als GVO, wird wiederum der Ausdruck «mit dem Einsatz von GVO» bedeutend. Gelten sie nicht als GVO, stellt sich als nächstes die Frage, was «mit dem Einsatz rekombinanter Nukleinsäuremolekülen» gemeint sein könnte. Gemäss erläuterndem Bericht zur FrSV (EDI 1997) sind rekombinante Nukleinsäuren gentechnisch veränderte DNA-Abschnitte. Da die transient eingeführten Gene als rekombinante Nukleinsäuren gelten können, ist zu diskutieren, wie der Ausdruck «mit dem Einsatz» auszulegen ist. Kann die

Auslegung davon abhängen, ob die rekombinanten Nukleinsäuren die Veränderung am genetischen Material unmittelbar oder mittelbar erzeugen? Im Falle der NRE-Technik erfolgt die Erzeugung mittelbar via die Expression der Gene.

Neben der stabilen Transformation und transienten Transfektion können die Gene bei der NRE-Technik auch mit viralen Vektoren in Pflanzen eingeführt werden. Obwohl die viralen Vektoren GVO sind, dürfte hier der Ausdruck «mit dem Einsatz von GVO» keine Wirkung zeigen, da die Pflanze selbst zu Beginn des Verfahrens nicht gentechnisch verändert ist<sup>30</sup>. Ob der Ausdruck «mit dem Einsatz rekombinanter Nukleinsäuremoleküle» zur Geltung kommen könnte, ist zu klären.

Wie aus den obigen Darstellungen hervorgeht, kann es bei Verfahren, in denen es zur Erzeugung von Basenaustauschmutationen, Indels, und Gendeletionen kommt, zu einer Sache der Auslegung werden, ob die resultierenden Sorten auch dann als GVO zu gelten haben, wenn sie das ursprünglich eingeführte genetische Material nicht mehr besitzen. Inwiefern dies auch bei Verfahren zutrifft, in denen Epiallele<sup>31</sup> erzeugt werden oder während denen es zu unbeabsichtigten somaklonalen Variationen<sup>32</sup> kommen kann, ist zu prüfen. Zu klären dürfte auch sein, ob folgende Begriffe und Ausdrücke rechtlich zu konkretisieren sind: «genetisches Material», «rekombinante Nukleinsäuremoleküle», «mit dem Einsatz von GVO», «mit dem Einsatz von rekombinanten Nukleinsäuren».

## 5. Regulatorische Aspekte

In den folgenden Abschnitten werden Aspekte dargestellt und Fragen aufgeworfen, die bei der Regulierung der Sorten aus den neuen Verfahren eine Rolle spielen beziehungsweise zu beantworten sein könnten. Der Fokus liegt dabei auf der Gentechnikgesetzgebung. Inwiefern die neuen Verfahren im Geltungsbereich der Lebensmittel- und Landwirtschaftsgesetzgebung Fragen aufwerfen werden, wird nicht oder nur am Rande angesprochen<sup>33</sup>.

### 5.1 Biosicherheit

Neu gezüchtete Pflanzensorten dürfen in der Schweiz nur dann in die Umwelt freigesetzt oder in Verkehr gebracht werden, wenn sie den Menschen, die Tiere oder die Umwelt nicht gefährden und die biologische Vielfalt und deren nachhaltige Nutzung nicht beeinträchtigen (Art. 6 GTG, Art. 29a USG). Diese Norm gilt unabhängig davon, ob eine Sorte rechtlich als GVO klassiert wird oder nicht. Abhängig von der GVO-Klassierung sind hingegen die Intensität der staatlichen Aufsicht und die zu erfüllenden Sicherheitsanforderungen. Bei nicht als GVO klassierten Sorten haben Hersteller und Importeure in Eigenverantwortung dafür zu sorgen, dass beim Umgang mit den Sorten Gefährdungen und Beeinträchtigungen der Schutzgüter vermieden werden. Der Staat kann dabei die Einhaltung der Sorgfaltspflicht (Art. 6 FrSV) und die Wahrnehmung der Selbstkontrolle (Art. 4 FrSV)

---

<sup>30</sup> Eine Pflanze, in deren Gewebe ein rekombinantes Virus eingeführt wird, fällt zwar unter die Gentechnikgesetzgebung, dürfte aber selber nicht als GVO gelten, sondern als Pflanze, die einen GVO enthält.

<sup>31</sup> Können neue Epiallele im Sinne der Gentechnikgesetzgebung eine Veränderung am genetischen Material sein?

<sup>32</sup> Somaklonale Variationen sind Veränderungen am genetischen Material, die bei In-vitro-Kulturen von Zellen, Kalli oder Organen auftreten können. Bei der stabilen Transformation und der transienten Transfektion können sich in der Zellkultur solche somaklonalen Variationen ereignen.

<sup>33</sup> Nicht behandelt wird beispielsweise die Frage, ob Sorten aus den neuen Verfahren gemäss Verordnung über die biologische Landwirtschaft und die Kennzeichnung biologisch produzierter Erzeugnisse und Lebensmittel (Bio-Verordnung) im Biolandbau eingesetzt werden dürften oder nicht. Inwiefern die neuen Verfahren gemäss privater Richtlinien im Biolandbau einsetzbar bzw. nicht einsetzbar sind, ist eine Frage, die auch innerhalb des Biolandbaus diskutiert wird (z.B. Messmer 2011, Haring 2009, Lammerts van Bueren et al. 2008/2007).

prüfen. Bei als GVO klassierten Sorten hingegen obliegt das Vermeiden von Gefährdungen und Beeinträchtigungen der Schutzgüter einer strengen staatlichen Aufsicht: Freisetzungsversuche und das Inverkehrbringen unterstehen der Bewilligungspflicht (Art. 11 und 12 GTG), wobei hohe Anforderungen an die Sicherheit der Sorten gestellt werden<sup>34</sup>.

Das geltende Recht sieht sowohl für den Umgang mit nicht-GVO wie auch den Umgang mit GVO Ausnahmen vor: Bei Sorten, die nicht als GVO gelten, kann der Umgang als bewilligungspflichtig erklärt werden (Art. 29f USG, Art. 160 LwG). Bei GVO-Sorten wiederum sind Vereinfachungen der Bewilligungspflicht oder Ausnahmen davon möglich (Art. 14 GTG).

Ob und wie eine Pflanzensorte auf die Schutzgüter einwirkt, hängt von ihren Eigenschaften, der Art der Nutzung sowie dem Ausmass der Nutzung ab und lässt sich nur in einer Einzelfallprüfung feststellen. Ob eine etwaige Einwirkung zu einer Beeinträchtigung oder Gefährdung der Schutzgüter führt, hängt wiederum davon ab, welche Zustände der Schutzgüter als wünschenswert festgelegt sind, und ist ebenfalls im Einzelfall zu bewerten. Hinsichtlich der neuen Verfahren stellt sich die Frage, wer die Einzelfallprüfung und -bewertung vornimmt? Ist es je nach Verfahren gerechtfertigt, dass Prüfung und Bewertung einer strengen staatlichen Aufsicht obliegen? Oder ist es je nach Verfahren angemessen, Prüfung und Bewertung der Eigenverantwortung der Hersteller und Importeure zu unterstellen?

## 5.2 Schutz der Wahlfreiheit

Das GTG schreibt vor, dass durch den Umgang mit GVO die Wahlfreiheit der KonsumentInnen nicht beeinträchtigt werden darf (Art. 7 GTG). Sichergestellt wird die Wahlfreiheit unter anderem durch die Kennzeichnungsvorschriften (Art. 17 GTG). Sie sollen gewährleisten, dass KonsumentInnen eine autonome und sachkundige Produktauswahl treffen können. Um dies zu ermöglichen, hat der Gesetzgeber sowohl gentechnisch veränderte Organismen, die in Verkehr gebracht werden, unter die Kennzeichnungspflicht gestellt, wie auch Erzeugnisse, die aus diesen Organismen gewonnen werden (Art. 3 Abs. 2 GTG), und zwar unabhängig davon, ob die DNA der Organismen in den Erzeugnissen noch erkennbar ist oder nicht<sup>35</sup>.

Wie die neuen Pflanzenzuchtverfahren und insbesondere die aus ihnen hervorgehenden Sorten in Hinsicht auf das Ermöglichen der Wahlfreiheit zu handhaben sind, hängt nach geltendem Recht davon ab, ob die entstehenden Sorten als GVO klassiert werden oder nicht.

Wird entschieden, die Sorten eines der neuen Verfahren als GVO zu klassieren, so sind diese Sorten beim Inverkehrbringen als GVO zu kennzeichnen. Die Pflicht zur Kennzeichnung besteht auch für die aus den Sorten gewonnenen Lebens- und Futtermittel. Da die Sorten und die daraus erzeugten Produkte zu kennzeichnen sind, sind die Wahlfreiheit der KonsumentInnen (Lebensmittel) wie auch die Wahlfreiheit der LandwirtInnen (Saatgut, Futtermittel) ermöglicht. Während die Wahlfreiheit ermöglicht bleibt, können sich in gewissen Fällen neue Herausforderungen beim Vollzug ergeben. Ob die Kennzeichnungspflicht eingehalten wird, prüfen die Behörden üblicherweise, indem sie Proben auf das Vorhandensein von GVO testen. Falls die Sorten aus den neuen Verfahren und somit auch die aus ihnen gewonnenen Erzeugnisse stofflich nicht eindeutig als GVO identifizierbar sind (Abschnitt 4.3), können die Behörden bei ihren Kontrollen keine Tests durch-

---

<sup>34</sup> Dass beim Umgang mit gentechnisch veränderten Sorten strenge Sicherheitsstandards eingehalten werden müssen, die weit über denen für herkömmliche Sorten liegen, hat zur Folge, dass sich die Zulassungskosten massiv erhöhen. In der EU beispielsweise kostet die Registrierung einer herkömmlichen Sorte im Sortenkatalog einige 10'000 Franken, die Kosten für die Bewilligung einer neuen gentechnisch veränderten Pflanze hingegen liegen laut Schätzungen bei fünf bis zehn Millionen Franken.

<sup>35</sup> Die FrSV verlangt für Produkte, die «aus GVO hergestellt» sind, keine Kennzeichnung (Art. 10 FrSV). Anderes gilt im Futtermittel- und im Lebensmittelbereich.



führen, sondern allein schriftliche Unterlagen heranziehen. Da der Agrarhandel international ist, wird eine lückenlose Überprüfung schwierig.

Wird entschieden, die Sorten eines der neuen Verfahren nicht als GVO zu klassieren, so fallen sie auch nicht unter die Kennzeichnungspflicht. Neue Herausforderungen für den Vollzug ergeben sich nicht. Da die Sorten und die daraus erzeugten Produkte nicht zu kennzeichnen sind, steht jedoch zur Diskussion, ob die Wahlfreiheit beeinträchtigt wird, wenn die Anwendungen der Gentechnik im Züchtungsprozess für KonsumentInnen und LandwirtInnen unsichtbar bleiben?

Mit der Entwicklung der neuen Zuchtverfahren stellt sich im Bereich Saat- und Pflanzgut somit eine Frage, die bisher vor allem im Lebensmittelbereich zu anhaltenden politischen Diskussionen führt: Wie umfassend soll die Prozesskennzeichnung sein?

Das GTG schreibt keine umfassende Prozesskennzeichnung vor; kennzeichnungspflichtig sind allein GVO und daraus gewonnene Erzeugnisse, nicht aber Produkte, die mit Hilfe von GVO oder daraus gewonnenen Erzeugnissen hergestellt werden. Ob die Reichweite der Prozesskennzeichnung wegen den neuen Zuchtverfahren neu zu verhandeln ist, bleibt zu diskutieren.

Ein weiterer Aspekt, der im Hinblick auf die neuen Verfahren Beachtung verdienen könnte, ist die so genannte Negativdeklaration. Gemäss GTG kann der Bundesrat regeln, dass Organismen, die nicht gentechnisch verändert sind, als solche gekennzeichnet werden (Art. 17 Abs. 5 GTG). Im Lebensmittelbereich findet sich in der Verordnung über gentechnisch veränderte Lebensmittel (VGVL) eine entsprechende Regelung dazu (Art. 7 Abs. 8 VGVL). Sie ist auf das Bedürfnis von KonsumentInnen ausgerichtet, die bei ihrer Ernährung GVO in jeglicher Hinsicht vermeiden wollen. Ob im Hinblick auf die neuen Pflanzenzuchtverfahren eine entsprechende Regelung auch im Saat- und Pflanzgutbereich zweckmässig wäre, bleibt zu diskutieren.

### **5.3 Schutz der Produktion ohne gentechnisch veränderte Organismen**

Nach Art. 7 GTG darf mit GVO nur so umgegangen werden, dass sie die Produktion von Erzeugnissen ohne GVO nicht beeinträchtigen. Ob diese materielle Norm bei den aus den neuen Verfahren hervorgehenden Sorten einzuhalten ist, hängt davon ab, ob die Sorten als GVO klassiert werden oder nicht. Werden sie als GVO klassiert, müsste beim Umgang mit ihnen dafür gesorgt werden, dass keine Vermischungen mit Erzeugnissen ohne GVO eintreten, die über den Kennzeichnungsschwellenwerten von Saatgut, Lebens- und Futtermittel liegen. In den Fällen, in denen die aus den neuen Verfahren hervorgehenden Sorten nicht eindeutig als GVO identifizierbar sind (Abschnitt 4.3), würde sich die Frage stellen, wie die Einhaltung der Norm zu kontrollieren ist.

### **5.4 Achtung der Würde der Kreatur**

Gestützt auf Artikel 120 Absatz 2 der Bundesverfassung schreibt das GTG vor, dass bei Tieren und Pflanzen durch gentechnische Veränderung des Erbmaterials die Würde der Kreatur nicht missachtet werden darf (Art. 8 GTG). Das GTG verlangt somit, dass nicht nur bei Tieren, sondern auch bei Pflanzen die Würde der Kreatur geachtet wird.

Ungeachtet dessen, dass die Würde der Kreatur bei Pflanze in der Praxis kaum beeinträchtigt werden dürfte, stellt sich aus regulatorischer Sicht die Frage, wie die neuen Pflanzenzuchtverfahren und die aus ihnen entstehenden Sorten in Hinsicht auf die Achtung der Würde der Kreatur zu handhaben sind?

Die Tätigkeit, bei der die Würde der Kreatur bei Pflanzen missachtet werden könnte, ist die gentechnische Veränderung des Erbguts im geschlossenen System<sup>36</sup>. Hier stellt sich nun die Frage, was unter gentechnischer Veränderung zu verstehen ist: Ist damit allein die Insertion von eingeführtem genetischem Material ins Erbgut gemeint? Oder können auch andere Änderungen im Erbgut als gentechnische Veränderung gelten, wenn sie mittels gentechnischer Methoden erzeugt worden sind? Im ersten Fall wäre die Würde der Pflanze immer dann zu achten, wenn bei der Anwendung der neuen Verfahren eine Pflanze mit neu inserierten Genen entsteht – sei es als Endprodukt oder in einem Zwischenschritt des Verfahrens. Im zweiten Fall müsste die Würde der Pflanze bei allen Sorten geachtet werden, bei denen mit den neuen Verfahren Veränderungen im genetischen Material hervorgerufen werden.

In der FrSV richten sich die formellen Anforderungen zur Achtung der Würde der Kreatur an den Umgang mit GVO. Bei Gesuchen zum Freisetzen und Inverkehrbringen von gentechnisch veränderten Pflanzen ist demnach in einer Interessenabwägung darzulegen, dass durch die gentechnische Veränderung die Würde der Kreatur nicht missachtet worden ist (Art. 19 Abs. 2 Bst. f FrSV bzw. Art. 28 Art. 2 Bst. f FrSV). Diese Anforderung müsste in den Fällen eingehalten werden, in denen die Sorten aus den neuen Verfahren rechtlich als GVO klassiert werden.

### **5.5 Erkennung und Identifikation von Sorten aus den neuen Verfahren**

Die Verfügbarkeit von Testmethoden, mit denen sich GVO erkennen und identifizieren lassen, spielt eine wichtige Rolle beim Vollzug der Gentechnikgesetzgebung. Testmethoden sind notwendig, um bewilligtes und unbewilligtes Material zu unterscheiden oder die Einhaltung der Kennzeichnungspflicht zu überprüfen. Eine gentechnisch veränderte Pflanze wird in der Schweiz nur dann für Freisetzungsversuche und das Inverkehrbringen bewilligt, wenn eine Nachweismethode für die Pflanze zur Verfügung steht (Art. 19 Abs. 2 Bst. b FrSV bzw. Art. 28 Abs. 2 Bst. a FrSV). Für den Vollzug der Gentechnikgesetzgebung entstünden in den Fällen neue Herausforderungen, in denen die Sorten aus den neuen Verfahren rechtlich als GVO klassiert werden, die eindeutige Identifizierung der Sorten aber nicht möglich ist (siehe dazu Abschnitt 4.3).

### **5.6 Internationale Handelsbeziehungen**

Die Schweiz führt Pflanzensorten und daraus hergestellte Produkte sowohl ein als auch aus. Ob sich bei der Ein- und Ausfuhr von Sorten aus den neuen Pflanzenzuchtverfahren auch neue regulatorische Fragen ergeben werden, dürfte davon abhängen, wie die Sorten in den einzelnen Ländern reguliert werden und ob die jeweiligen Regulierungen sich von der hiesigen Regulierung unterscheiden.

Welche Ansätze zur Regulierung der neuen Verfahren international verfolgt werden, ist in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht worden. Bekannt ist, dass die regulatorischen Fragen in verschiedenen Ländern von den zuständigen Behörden und Kommissionen diskutiert werden (Lusser & Rodriguez-Cerezo 2012, ZKBS 2012, ACRE 2011, NTWG 2011, COGEM 2010/2009a/2009b/2006a, BAC 2007) und auch in der Literatur ein Thema sind (z.B. Halford 2012, Haroldsen et al. 2012b, Le Roux et al. 2012, Lusser et al. 2012, Wackernagel 2012, Waltz 2012, Durham et al. 2011, Kuzma & Kokotovich 2011, Tait & Barker 2011, Prins & Kok 2010, Breyer et al. 2009, Christensen & Müller 2009b, Russel & Sparrow 2008). In den USA hat das Landwirtschaftsministerium

---

<sup>36</sup> Wer mit gentechnisch veränderten Pflanzen im geschlossenen System umgeht, muss gemäss Art. 5 Abs. 3 ESV vor dem Umgang mittels Interessensabwägung nach Art. 8 GTG sicherstellen, dass die Würde der Kreatur nicht missachtet wird.

(USDA) einen Entscheid zur Regulierung der ODM (APHIS 2004) und der Zentromer-vermittelten Genomelimination (APHIS 2011e) sowie Einzelfallentscheide zu bestimmten Sorten aus der Cisgenese (APHIS 2012a/b), Meganukleasen-Technik (APHIS 2011a), der Beschleunigten Züchtung (APHIS 2011b/c), der *Seed Production Technology* (Waltz 2012), der ZFN-Technik (APHIS 2012b, 2010), der epigenetischen Züchtung (APHIS 2012g) sowie auch zu gewissen Anwendungen der Transgenese (APHIS 2012d/e/f, 2011d, Ledford 2011, Waltz 2011a) gefällt. Die US-Umweltschutzagentur (EPA) plant zudem, die Regulierung von cisgenen Pflanzen zu ändern (Reardon 2011, Waltz 2011b).

Die EU ist im Agrarbereich der wichtigste Handelspartner der Schweiz, weshalb der Bund die Strategie verfolgt, technische Handelshemmnisse zu vermeiden und die bestmögliche Harmonisierung mit dem EU-Recht zu erreichen. Aufgrund der Bedeutung der EU wird im Folgenden kurz dargestellt, wie die EU-Kommission bisher auf die Entwicklung der neuen Pflanzenzuchtverfahren reagiert hat.

### 5.6.1 Abklärungen der EU-Kommission

In der EU sind bisher keine Entscheidungen zur Regulierung der neuen Pflanzenzuchtverfahren getroffen worden. Die EU-Kommission hat jedoch auf die Entwicklung reagiert und insbesondere zu folgenden Verfahren Abklärungen eingeleitet: Agroinfiltration, Cisgenese, Intragenese, Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese, Pfropfen, RNA-dirigierte DNA-Methylierung, Reverse Breeding und Zinkfinger-Nukleasen-Technik. Die dazu eingeleiteten Abklärungen sind:

- Im Oktober 2007 richtete die EU-Kommission auf Antrag der für die Richtlinie 2001/18/EG zuständigen Behörden der EU-Länder die *New Techniques Working Group* (NTWG) ein. Die NTWG überprüfte die ausgewählten neuen Verfahren im Kontext der EU-Gentechnikgesetzgebung. Sie klärte dabei, ob die Verfahren zu genetischen Veränderungen führen und, falls ja, die resultierenden Organismen unter den Geltungsbereich der Gentechnikgesetzgebung fallen sollen oder nicht. Der Schlussbericht der NTWG liegt seit Dezember 2011 vor (NTWG 2011).
- Im Jahr 2010 führte das *JRC Institute for Prospective Technological Studies* (IPTS) in Zusammenarbeit mit dem *JRC Institute for Health and Consumer Protection* (IHCP) im Auftrag der EU-Kommission eine Studie zu den ausgewählten neuen Pflanzenzuchtverfahren durch. Im Fokus der Mitte 2011 veröffentlichten Studie (Lusser et al. 2011) sind folgende Aspekte: der Stand der Forschung zu den neuen Verfahren, der Stand der Anwendungen im Züchtungssektor, das Potenzial für die Entwicklung kommerzieller Sorten und die Herausforderungen beim Nachweis von Sorten aus den neuen Verfahren.
- Im Februar 2011 beauftragte die EU-Kommission die EU-Lebensmittelsicherheitsbehörde (EFSA), die neuen Pflanzenzuchtverfahren unter die Lupe zu nehmen. Die EFSA soll dabei untersuchen, welche Risiken die einzelnen Verfahren für Menschen, Tiere und die Umwelt darstellen könnten und zwar unabhängig davon, ob die Produkte der neuen Verfahren unter die Gentechnikgesetzgebung fallen oder nicht. Zudem soll die EFSA klären, ob durch die neuen Verfahren ein Bedarf besteht, neue Leitlinien für die Risikoabschätzung zu erlassen oder Änderungen in den bestehenden Leitlinien vorzunehmen. Bisher hat die EFSA eine Meinung zur Cisgenese und Intragenese (EFSA 2012a) sowie eine Meinung zu einer der Varianten der NRE-Techniken veröffentlicht (EFSA 2012b).
- Im September 2011 führte das JRC den Workshop «*Comparative Situation of New Plant Breeding Techniques*» durch, an dem Fachleute und Behördenvertreter die Ansätze zur Regulierung der neuen Pflanzenzuchtverfahren in verschiedenen Ländern wie Australien, Argentinien, Japan, Kana-

da, Südafrika und EU diskutierten. Ein Bericht zum Workshop ist 2012 veröffentlicht worden (Lusser & Rodriguez-Cerezo 2012).

## **5.7 Weitere Aspekte**

Im Folgenden werden zwei weitere Aspekte geschildert, die bei der Regulierung der neuen Verfahren zu berücksichtigen sein könnten.

### **5.7.1 Wiederholte Anwendung von Verfahren an derselben Pflanze**

Mit dem ODM und Varianten der NRE-Techniken lassen sich an vorbestimmten Stellen des Erbguts gezielt Mutationen einführen. Bei der Entscheidung, wie diese Verfahren beziehungsweise die daraus hervorgehenden Sorten zu regulieren sind, könnte folgende Besonderheit zu berücksichtigen sein: Theoretisch ist es mit den genannten Verfahren möglich, in aufeinander folgenden Zyklen vollständig neue Sequenzen ins Erbgut einzufügen und so beispielsweise ein endogenes Gen umfassend zu ändern oder vor ein bisher nicht exprimiertes Gen einen Promotor zu stellen. Damit schwindet die klare Unterscheidung zwischen dem Erzeugen einer Mutation und dem Einführen eines neuen Gens.

Gegenwärtig ist eine aufeinander folgende Anwendung der Verfahren an der gleichen Pflanze kaum praktikierbar, da die Effizienz der ODM und der NRE-Techniken gering ist.

### **5.7.2 Überprüfung der Abwesenheit extrazellulär eingeführter DNA**

Aus Verfahren, in denen gentechnischer Methoden indirekt angewendet werden, können Sorten hervorgehen, die frei von extrazellulär eingeführtem genetischen Material sind. Aus regulatorischer Sicht kann hier die Frage gestellt werden, wer mit welchen Methoden vor einem Freisetzungsversuch beziehungsweise vor dem Inverkehrbringen einer Sorte die Abwesenheit des extrazellulär eingeführten genetischen Materials nachweist. Soll der Nachweis der Sorgfaltspflicht und der Selbstkontrolle des Herstellers oder der staatlichen Kontrolle unterliegen? Falls die Hersteller den Nachweis in Eigenverantwortung erbringen sollen, soll der Staat dann die Möglichkeit haben, die Einhaltung der Sorgfaltspflicht und der Selbstkontrolle zu überprüfen?

## Literatur

### A

Abdal-Aziz, S.A., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M.A., & Mercado, J.A. (2006). Evidence of frequent integration of non- T-DNA vector backbone sequences in transgenic strawberry plant. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 508 – 510.

ACRE (2011). Advice on a plant breeding technique involving oligo-directed mutagenesis: RTDS™. Advisory Committee on Releases to the Environment (ACRE). [www.defra.gov.uk/acre/files/20110319-Cibus-advice.pdf](http://www.defra.gov.uk/acre/files/20110319-Cibus-advice.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

Aguero, C.B., Uratsu, S.L., Greve, C., Powell, A.L.T., Labavitch, J.M., Meredith, C.P. & Dandekar, A.M. (2005). Evaluation of tolerance to Pierce's disease and Botrytis in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. *Molecular Plant Pathology* 6: 43 – 51.

Ananiev, E.V., Wu, C., Chamberlin, M.A., Svitashv, S., Schwartz, C., Gordon-Kamm, W. & Tingey, S. (2009). Artificial chromosome formation in maize (*Zea mays* L.). *Chromosoma* 118: 157 – 177.

APHIS (2004). Letter to Cibus. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), U.S. Department of Agriculture. [www.aphis.usda.gov/foia/foia\\_requests/2011/Biotechnology%20and%20Regulatory%20Services%20\(BRS\)/11-089%20Correspondence%20Concerning%20Regulatory%20Status%20of%207%20CFR%20Part%20340/11-089%20Records.pdf](http://www.aphis.usda.gov/foia/foia_requests/2011/Biotechnology%20and%20Regulatory%20Services%20(BRS)/11-089%20Correspondence%20Concerning%20Regulatory%20Status%20of%207%20CFR%20Part%20340/11-089%20Records.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

APHIS (2010). Review as to whether *Zea mays* plants with the IPKI gene deleted using zinc nuclease technology is regulated by APHIS. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), U.S. Department of Agriculture. [www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg\\_loi/DOW\\_ZFN\\_IPK1\\_052610.pdf](http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/DOW_ZFN_IPK1_052610.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

APHIS (2011a). Response on the regulatory status of plants engineered using meganuclease technology. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), U.S. Department of Agriculture. [www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg\\_loi/Response\\_Thenell\\_meganuclease\\_122011.pdf](http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/Response_Thenell_meganuclease_122011.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

APHIS (2011b). Confirmation on regulatory status of null segregant (NS) lines derived from genetically engineered (GE) plants in the 'FasTrack' plum breeding. Confirmation of the regulatory status of null segregant (NS) lines derived from genetically engineered (GE) plants in an accelerated tobacco breeding. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), U.S. Department of Agriculture. [www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg\\_loi/Drs%20Scorza%20and%20Callahan%20Final.pdf](http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/Drs%20Scorza%20and%20Callahan%20Final.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

APHIS (2011c). Confirmation of the regulatory status of null segregant (NS) lines derived from genetically engineered (GE) plants in an accelerated tobacco breeding. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), U.S. Department of Agriculture. [www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg\\_loi/Dr%20Ramsey%20S%20Lewis%20NCSC%20Final.pdf](http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/Dr%20Ramsey%20S%20Lewis%20NCSC%20Final.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

APHIS (2011d). Confirmation of regulatory status Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), U.S. Department of Agriculture. [www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/scotts\\_kbg\\_resp.pdf](http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/scotts_kbg_resp.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

APHIS (2011e). Confirmation of the regulatory status of offspring derived from genetically engineered plants using the centromere-mediated chromosome elimination (CCE) technique. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), U.S. Department of Agriculture. [www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg\\_loi/aphis\\_response\\_nzpfri\\_redacted.pdf](http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/aphis_response_nzpfri_redacted.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

APHIS (2012a). Confirmation of the regulatory status of grapevine with genes and regulatory elements of grapevine. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), U.S. Department of Agriculture.

[www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg\\_loi/Grapevine\\_Inquiry\\_BR\\_response\\_042412.pdf](http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/Grapevine_Inquiry_BR_response_042412.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

APHIS (2012b). Regulation of cisgenic scab resistant apple cultivar Gala and disease resistant cisgenic plants. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), U.S. Department of Agriculture. [www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg\\_loi/aphis\\_response\\_schouten.pdf](http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/aphis_response_schouten.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

APHIS (2012c). Review as to whether plant varieties created using zinc-finger nucleases techniques for targeted gene deletion are regulated by APHIS. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), U.S. Department of Agriculture. [www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg\\_loi/APHIS\\_response\\_DOW\\_ZFN\\_IPK1\\_030812.pdf](http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/APHIS_response_DOW_ZFN_IPK1_030812.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

APHIS (2012d). Confirmation of the regulatory status of TRG101B transgenic Switchgrass. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), U.S. Department of Agriculture. [www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg\\_loi/Ceres\\_Inquiry\\_BRS\\_Response.pdf](http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/Ceres_Inquiry_BRS_Response.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

APHIS (2012e). Confirmation of the regulatory status of Kentucky bluegrass genetically engineered without genetic material from plant pests. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), U.S. Department of Agriculture. [www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg\\_loi/scotts\\_0512\\_kbg.pdf](http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/scotts_0512_kbg.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

APHIS (2012f). Confirmation of the regulatory status of St. Augustinegrass genetically engineered without genetic material from plant pests. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), U.S. Department of Agriculture. [www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg\\_loi/Scotts\\_May2012\\_St\\_Augustinegrass.pdf](http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/Scotts_May2012_St_Augustinegrass.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

APHIS (2012g). Confirmation of the regulatory status of null segregant (NS) plants derived from genetically engineered plants in your breeding program. Animal and Plant Health Inspection Service, U.S. Department of Agriculture. [www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg\\_loi/Response\\_Mackenzie\\_060612.pdf](http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/Response_Mackenzie_060612.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

Arencibia, A., Carmona, E., Cornide, M.T. Castiglione, S., O'Reilly, J., China, A., Oramas, P. & Sala, F. (1999). Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane plants (*Saccharum hybrid*) plants produced by cell electroporation. *Transgenic Research* 8: 349 – 360.

Ayre, B.G. & Turgeon, R. (2004). Graft transmission of a floral stimulant derived from CONSTANS. *Plant Physiology* 135: 2271 – 2278.

## **B**

BAC (2007). Advice on the use of targeted gene repair as a strategy to develop novel organisms. Belgian Biosafety Advisory Council (BAC). [www.bio-council.be/docs/BAC\\_2007\\_SC\\_529.pdf](http://www.bio-council.be/docs/BAC_2007_SC_529.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

Bai, S., Kasai, A., Yamada, K., Li, T. & Harada, T. (2011). Mobile signal transported over a long distance induces systemic transcriptional gene silencing in a grafted partner. *Journal of Experimental Botany* 62: 4561 – 4570.

Bairu, M.W., Aremu, A.O. & Staden, J.V. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63: 147 – 173.

Barbaglia, A.M., Klusman, K.M., Higgins, J., Shaw, J.R., Hannah, L.C. & Lal, S.K. (2012). Gene capture by helitron transposons reshuffles the transcriptome of maize. *Genetics* 190: 965 – 975.

Becker, A. & Lange M. (2010). VIGS - genomics goes functional. *Trends in Plant Science* 15: 1 – 4.

Beetham, P.R., Kipp, P.B., Sawycky, X.L., Arntzen, C.J. & May, G.D. (1999). A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 8774 – 8778.

- Benfield, A.P., Macleod, M. C., Liu, Y., Wu, Q., Wensel, T.G. & Vasquez, K.M. (2008). Targeted generation of DNA strand breaks using pyrene-conjugated triplex-forming oligonucleotides. *Biochemistry* 47: 6279 – 6288.
- Benjamin, I., Kenigsbuch, D., Galperin, M., Abrameto, J.A. & Cohen, Y. (2009). Cisgenic melons over expressing glyoxylate-aminotransferase are resistant to downy mildew. *European Journal of Plant Pathology* 125: 355 – 365.
- Bertsch, C., Beuve, M., Dolja, V.V., Wirth, M., Pelsy, F., Herrbach, E. & Lemaire, O. (2009). Retention of the virus-derived sequences in the nuclear genome of grapevine as a potential pathway to virus resistance. *Biology Direct* 4: 21.
- Bhat, S.R. (2011). Genetic engineering of apomixis in plants: closer to reality. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 20: 1 – 4.
- Bhatt, A.M., Lister, C., Crawford, N. & Dean, C. (1998). The transposition frequency of Tag1 elements is increased in transgenic Arabidopsis lines. *Plant Cell* 10: 427 – 434.
- Birchler, J.A., Krishnaswamy, L., Gaeta, T., Masonbrink, R.E. & Zhao, C. (2010). Engineered minichromosomes in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 29: 135 – 147.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. & Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326: 1509 – 1512.
- Bogdanove, A.J. & Voytas, D.J. (2011). TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science* 33: 1843 – 1846.
- Böhlenius, H., Huang, T., Charbonnel-Campaa, L., Brunner, A.M., Jansson, S., Strauss, S.H. & Nilsson, O. (2006). The conserved CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science* 312: 1040 – 1043.
- Bortolotti, C., Murillo, I., Fontanet, P., Coca, M. & Segundo, B.S. (2005). Long-distance transport of the maize pathogenesis-related PRms protein through the phloem in transgenic tobacco plants. *Plant Science* 168: 813 – 821.
- Bregitzer, P., Halbert, S.E. & Lemaux, P.G. (1998). Somaclonal variation in the progeny of transgenic barley. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 421 – 425.
- Breyer, D., Herman, P., Brandenburger, A., Gheysen, G., Remaut, E., Soumillion, P., Van Doorselaere, J., Custers, R., Pauwels, K., Sneyers, M. & Reheul, D. (2009). Genetic modification through oligonucleotide-mediated mutagenesis. A GMO regulatory challenge? *Environmental Biosafety Research* 8: 57 – 64.
- Broeders, S.R.M., De Keersmaecker, S.C.J. & Roosens, N.H.C. (2012). How to deal with the upcoming challenges in GMO detection in food and feed. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Article ID 402418
- Brownfield, L. & Köhler, C. (2011). Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects. *Journal of Experimental Botany* 62: 1659 – 1668.
- Bubner, B., Gase, K., Berger, B., Link, D. & Baldwin, I.T. (2006). Occurrence of tetraploidy in *Nicotiana attenuata* plants after *Agrobacterium*-mediated transformation is genotype specific but independent of polysomaty of explant tissue. *Plant Cell Reports* 25: 668 – 675.

## C

- Cai, C.Q., Doyon, Y., Ainley, W.M., Miller, J.C., Dekelver, R.C., Moehle, E.A., Rock, J.M., Lee, Y.L., Garrison, R., Schulenberg, L., Blue, R., Worden, A., Baker, L., Faraji, F., Zhang, L., Holmes, M.C., Rebar, E.J., Collingwood, T.N., Rubin-Wilson, B., Gregory, P.D., Urnov, F.D. & Petolino, J.F. (2009). Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. *Plant Molecular Biology* 69: 699 – 709.
- Carlson, S.R., Rudgers, G.W., Zieler, H., Mach, J.M., Luo, S., Grunden, E., Krol, C., Copenhaver, G.P. & Preuss, D. (2007). Meiotic transmission of an in vitro-assembled autonomous maize minichromosome. *PLoS Genetics* 3: e179.

- Carroll, D., Morton, J.J., Beumer, K.J. & Segal, D.J. (2006). Design, construction and in vitro testing of zinc finger nucleases. *Nature Protocols* 1: 1329 – 1341.
- Carvin, C.D., Parr, R.D. & Kladde, M.P. (2003). Site-selective in vivo targeting of cytosine-5 DNA methylation by zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Research* 31: 6493 – 6501.
- Cellini, F., Chesson, A., Colquhoun, I., Constable, A., Davies, H.V., Engel, K.H., Gatehouse, A.M.R., Kärenlampi, S., Kok, E.J., Leguay, J.-J., Lehasranta, S., Noteborn, H.P.J.M., Pedersen, J. & Smith, M. (2004). Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food and Chemical Toxicology* 42: 1089 – 1125.
- Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J. & Voytas, D.F. (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research* 39: e82
- Cervera, M., Navarro, L. & Pena, L. (2009). Gene stacking in 1-year-cycling APETALA1 citrus plants for a rapid evaluation of transgenic traits in reproductive tissues. *Journal of Biotechnology* 140: 278 – 282.
- Chan, S.W.L. (2010). Chromosome engineering: power tools for plant genetics. *Trends in Biotechnology* 28: 605 – 610.
- Chiba, S., Kondo, H., Tani, A., Saisho, D., Sakamoto, W., Kanematsu, S. & Suzuki N. (2011). Widespread endogenization of genome sequences of non-retroviral RNA viruses into plant genomes. *PLoS Pathogens* 7: e1002146.
- Chilton, M-D. & Que, Q. (2003). Targeted integration of T-DNA into the tobacco genome at double-strand breaks: new insights on the mechanism of T-DNA integration. *Plant Physiology* 133: 956 – 965.
- Christensen, B. & Müller, R. (2009a). *Kalanchoe blossfeldiana* transformed with rol genes exhibits improved postharvest performance and increased ethylene tolerance. *Postharvest Biology and Technology* 51: 399 – 406.
- Christensen, B. & Müller, R. (2009b). The use of *Agrobacterium rhizogenes* and its rol-genes for quality improvement in ornamentals. *European Journal of Horticultural Science* 74: 275 – 287.
- Christensen, B., Sriskandarajah, S., Serek, M. & Mueller, R. (2008). Transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* with rol genes is useful in molecular breeding towards compact growth. *Plant Cell Reports* 27: 1485 – 1495.
- Christensen, B., Sriskandarajah, S. & Müller, R. (2009). Biomass distribution in *Kalanchoe blossfeldiana* Transformed with rol-genes of *Agrobacterium rhizogenes*. *HortScience* 44: 1233 – 1237.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J. & Voytas, D.F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186: 757 – 761.
- Cibus (2009). BASF and Cibus Achieve Development Milestone in CLEARFIELD® Production System. Press Release. <http://www.cibus.com/press/press012709.php> (zuletzt besucht am 19. September 2012).
- Cigan, A.M., Unger-Wallace, E. & Haug-Collet, K. (2005). Transcriptional gene silencing as a tool for uncovering gene function in maize. *Plant Journal* 43: 929 – 940.
- Circelli, P., Donini, M., Villani, M.E., Benvenuto, E. & Marusic, C. (2010). Efficient *Agrobacterium*-based transient expression system for the production of biopharmaceuticals in plants. *Bioengineered Bugs* 1: 221 – 224.
- COGEM (2006a). New techniques in plant biotechnology. COGEM report CGM/061024-02. The Netherlands Commission on Genetic Modification. [www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/new-techniques-in-plant-biotechnology](http://www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/new-techniques-in-plant-biotechnology) (zuletzt besucht am 19. September 2012).
- COGEM (2006b). Ethical and societal aspects of cisgenesis. COGEM report CGM/060706-03. The Netherlands Commission on Genetic Modification. [www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/ethical-and-societal-aspects-of-cisgenesis](http://www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/ethical-and-societal-aspects-of-cisgenesis) (zuletzt besucht am 19. September 2012).



COGEM (2009a). Zinc finger on the pulse. COGEM Report CGM/090616-02. The Netherlands Commission on Genetic Modification. [www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/zinc-finger-on-the-pulse-developments-and-implications-of-zinc-finger-technology](http://www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/zinc-finger-on-the-pulse-developments-and-implications-of-zinc-finger-technology) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

COGEM (2009b). Should EU legislation be updated? Scientific developments throw new light on the process and product approaches. COGEM Report CGM/090626-03. The Netherlands Commission on Genetic Modification. [www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/should-eu-legislation-be-updated-scientific-developments-throw-new-light-on-the-process-and-product-approaches](http://www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/should-eu-legislation-be-updated-scientific-developments-throw-new-light-on-the-process-and-product-approaches) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

COGEM (2010). The status of oligonucleotides within the context of site-directed mutagenesis. COGEM advice and report CGM/100701-03. The Netherlands Commission on Genetic Modification. [www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/the-status-of-oligonucleotides-within-the-context-of-site-directed-mutagenesis](http://www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/the-status-of-oligonucleotides-within-the-context-of-site-directed-mutagenesis) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

Connor, T. (2010). New techniques for genetic modification of plants. Internal report prepared for The New Zealand Institute for Plant & Food Research Limited. [www.esr.cri.nz/SiteCollectionDocuments/ESR/PDF/SocialScience/3693TracyWilliams.pdf](http://www.esr.cri.nz/SiteCollectionDocuments/ESR/PDF/SocialScience/3693TracyWilliams.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

Conner, A.J., Barrell, P.J., Baldwin, S.J., Lokerse, A.S., Cooper, P.A., Erasmuson, A.K., Nap, J.-P. & Jacobs, J.M.E. (2007). Intragenic vectors for gene transfer without foreign DNA. *Euphytica* 154: 341 – 353.

Copenhaver, G.P. & Preuss, D. (2010). Haploidy with histones. *Nature Biotechnology* 28: 423 – 424.

Coutos-Thevenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, A., Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R. & Boulay, M. (2001). In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *Journal of Experimental Botany* 52: 901 – 910.

Cubas, P., Vincent, C. & Coen, E. (1999). An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* 401: 157–161.

Cubero, J., Lastra, B., Salcedo, C.I., Piquer, J. & López, M.M. (2006). Systemic movement of *Agrobacterium tumefaciens* in several plant species. *Journal of Applied Microbiology* 101: 412 – 421.

Cullen, D., Harwood, W.A., Smedley, M.A., Davies, H. & Taylor, M. (2011). Comparison of DNA walking methods for isolation of transgene-flanking regions in GM potato. *Molecular Biotechnology* 49: 19 – 31.

Curtin, S.J., Zhang, F., Sander, J.D., Haun, W.J., Starker, C., Baltus, N.J., Reyon, D., Dahlborg, E.J., Goodwin, M.J., Coffman, A.P., Dobbs, D., Joung, J.K., Voytas, D.F. & Stupar, R.M. (2011). Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases breakthrough technologies. *Plant Physiology* 156: 466 – 473.

Curtin, S.J., Voytas, D.F. & Stupar, R.M. (2012). Genome engineering of crops with designer nucleases. *The Plant Genome* 5: 42 – 50.

## **D**

Darbani, B., Eimanifar, A., Stewart, C.N., Jr. & Camargo, W.N. (2007). Methods to produce marker-free transgenic plants. *Biotechnology Journal* 2: 83 – 90.

Debener, T. & Winkelmann, T. (2010). Ornamentals. In: Kempken, F. & Jung, C. (eds.), *Genetic Modification of Plants, Biotechnology in Agriculture and Forestry 64*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 369 – 391.

De Cock Buning, T., Lammerts Van Bueren, E.T., Haring, M.A., De Vriend, H.C. & Struik, P.C. (2006). 'Cisgenic' as a product designation. *Nature Biotechnology* 24: 1329 – 1331.

De Pater, S., Neuteboom, L.W., Pinas, J.E., Hooykaas, P.J. & van der Zaal, B.J. (2009). ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in *Arabidopsis* through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnology Journal* 7: 821 – 835.

- Dhar, M.K., Kaul, S. & Kour, J. (2011). Towards the development of better crops by genetic transformation using engineered plant chromosomes. *Plant Cell Reports* 30: 799 – 806.
- Dhekney, S.A., Li, Z.T. & Gray, D.J. (2011). Grapevines engineered to express cisgenic *Vitis vinifera* thaumatin-like protein exhibit fungal disease resistance. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 47: 458 – 466.
- Di Stilio, V.S. (2011). Empowering plant evo-devo: Virus induced gene silencing validates new and emerging model systems. *BioEssays* 33: 783 – 783.
- Dirks, R.H.G., van Dun, C.M.P. & Reinink, K. (2003). Reverse Breeding. Intl. Publ. No. WO 03/017753 A2. World Intellectual Property Organisation. Geneva, Switzerland.
- Dirks, R., van Dun, K., de Snoo, C.B., van den Berg, M., Lelivelt, C.L., Voermans, W., Woudenberg, L., de Wit, J.P., Reinink, K., Schut, J.W., van der Zeeuw, E., Vogelaar, A., Freymark, G., Gutteling, E.W., Keppel, M.N., van Drongelen, P., Kieny, M., Ellul, P., Touraev, A., Ma, H., de Jong, H. & Wijnker, E. (2009). Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis. *Plant Biotechnology Journal* 7: 837 – 845.
- Dong, C., Beetham, P., Vincent, K. & Sharp, P. (2006). Oligonucleotide-directed gene repair in wheat using a transient plasmid gene repair assay system. *Plant Cell Reports* 25: 457 – 465.
- Dong, A., Jun, Y. & Zhang, P. (2012). Transcriptome profiling of low temperature-treated cassava apical shoots showed dynamic responses of tropical plant to cold stress. *BMC Genomics*. 13: 64.
- Duan, Y.X., Fan, J. & Guo, W.W. (2010). Regeneration and characterization of transgenic kumquat plants containing the Arabidopsis APETALA1 gene. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 100: 273 – 281.
- Durai, S., Mani, M., Kandavelou, K., Wu, J., Porteus, M.H. & Chandrasegaran, S. (2005). Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 33: 5978 – 5990.
- Durham, T., Doucet, J. & Unruh Snyder, L. (2011). Risk of regulation or regulation of risk? A de minimus framework for genetically modified crops. *AgBioForum* 14: 61 – 70.
- Dutt, M., Z.T. Li, K. Kelley, S.A. Dhekney, M. Van Aman, J. Tattersall, & D.J. Gray (2007). Transgenic rootstock protein transmission in grapevines. *Acta Horticulturae (ISHS)* 738: 749 – 754.

## E

- Eamens, A., Wang, M.B., Smith, N.A. & Waterhouse, P.M. (2008). RNA silencing in plants: yesterday, today and tomorrow. *Plant Physiology* 147: 456 – 468.
- EDI (1997). Erläuternder Bericht zur Verordnung über den Umgang mit Organismen in der Umwelt (Freisetzungsverordnung, FSV). Eidgenössisches Departement des Innern (EDI), Bern.
- EFSA (2012a). Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. *EFSA Journal* 10: 2561. [www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/2561.pdf](http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/2561.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).
- EFSA (2012b). Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using Zinc Finger Nuclease 3 and other Site-Directed Nucleases with similar function. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. *EFSA Journal* 10: 2943. [www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/2943.pdf](http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/2943.pdf) (zuletzt besucht am 5. Dezember 2012).
- Eichten, S.R., Swanson-Wagner, R.A., Schnable, J.C., Waters, A.J., Hermanson, P.J., Liu, S., Jeh, C., Gendler, K., Freeling, M., Schnable, P.S., Vaughn, M.W. & Springer, N.M. (2011). Heritable epigenetic variation among maize inbreds. *PLoS Genetics* 7: e1002372.
- Ellul, P., Garcia-Sogo, B., Pineda, B., Rios, G., Roig, L.A. & Moreno, V. (2003). The ploidy level of transgenic plants in Agrobacterium mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* L.Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 231 – 238.

Elmer, J.S., Sunter, G., Gardiner, W.E., Brand, L., Browning, C.K., Bisaro, D.M. & Rogers, S.G. (1988). Agrobacterium-mediated inoculation of plants with tomato golden mosaic virus DNAs. *Plant Molecular Biology* 10: 225 – 234.

Elrouby, N. & Bureau, T.E. (2010). Bs1, a new chimeric gene formed by retrotransposon-mediated exon shuffling in maize. *Plant Physiology* 153: 1413 – 1424.

Endo, T., Shimada, T., Fujii, H., Kobayashi, Y., Araki, T. & Omura, M. (2005). Ectopic expression of a FT homolog from Citrus confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic Research* 14: 703 – 712.

Endo, M., Osakabe, K., Ono, K., Handa, H., Shimizu, T. & Toki, S. (2007). Molecular breeding of a novel herbicide-tolerant rice by gene targeting. *Plant Journal* 52: 157 – 166.

Errass, C. (2006). *Öffentliches Recht der Gentechnologie im Ausserhumanbereich*. Stämpfli Verlag AG, Bern.

Escobar, M.A., Leslie, C.A., McGranahan, G.H. & Dandekar, A.M. (2002). Silencing crown gall disease in walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Science* 163: 591 – 597.

Evans, D.A., Sharp, W.R. & Medina-Filho, H.P. (1984). Somaclonal and gametoclonal variation. *American Journal of Botany* 71: 759 – 774.

Even-Faitelson, L., Samach, A., Melamed-Bessudo, C., Avivi-Ragolsky, N. & Levy, A.A. (2011). Localized egg-cell expression of effector proteins for targeted modification of the Arabidopsis genome. *Plant Journal* 68: 929 – 937.

## F

Febres, V., Fisher, L., Khalaf, A. & Moore, G.A. (2011). Citrus transformation: challenges and prospects. <http://cdn.intechweb.org/pdfs/18815.pdf> (zuletzt besucht am 19. September 2012).

Federal Register (2011). Pioneer Hi-Bred International, Inc.; Determination of nonregulated status for corn genetically engineered to produce male sterile/female inbred plants. *Federal Register* Volume 76, Number 124 (Tuesday, June 28, 2011).

Fernandez, P., Rienzo, J.D., Fernandez, L. Hopp, H.E. Paniego, N. & Heinz, R.A. (2008). Transcriptomic identification of candidate genes involved in sunflower responses to chilling and salt stresses based on cDNA microarray analysis. *BMC Plant Biology* 8: 11.

Ferrie, A.M.R. & Möllers, C. (2011). Haploids and doubled haploids in Brassica spp. for genetic and genomic research. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 104: 375 – 386.

Fieldes, M.A., Schaeffer, S.M., Krech, M.J. & Brown, J.C.L. (2005). DNA hypomethylation in 5-azacytidine-induced early-flowering lines of flax. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 136 – 149.

Filipecki, M. & Malepszy, S. (2006). Unintended consequences of plant transformation: a molecular insight. *Journal of Applied Genetics* 47: 277 – 286.

Flachowsky, H., Hättasch, C., Peil, A. & Hanke, M.-V. (2006). Transcription profiling on transgenic apple plants after over-expression of genes, which are involved in the flower development. *Acta Horticulturae* 763: 215 – 222.

Flachowsky, H., Peil, A., Sopanen, T., Elo, A. & Hanke, V. (2007). Overexpression of BpMADS4 from silver birch (*Betula pendula* Roth.) induces early flowering in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Breeding* 126: 137 – 145.

Flachowsky, H., Hanke, M.V., Peil, A., Strauss, S.H. & Fladung, M. (2009). A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants. *Plant Breeding* 128: 217 – 226.

Flachowsky, H., Le Roux, P. M., Peil, A., Patocchi, A., Richter, K. & Hanke, M.-V. (2011). Application of a high-speed breeding technology to apple (*Malus × domestica*) based on transgenic early flowering plants and marker-assisted selection. *New Phytologist* 192: 364 – 377.

Fladung, M. (2011). Gentechnisch veränderte Bäume für eine nachhaltige, umweltverträgliche und ressourcenschonende Produktion von Holz für die Energiegewinnung. *Gesunde Pflanzen* 63: 101 – 110.

Forster, B.P., Heberle-Bors, E., Kasha, K.J. & Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science* 12: 368 – 375.

Freiman, A., Shlizerman, L., Golubowicz, S., Yabloviz, Z., Korchinsky, R., Cohen, Y., Samach, A., Chevreau, E., Le Roux, P.M., Patocchi, A. & Flaishman, M.A. (2012). Development of a transgenic early flowering pear (*Pyrus communis* L.) genotype by RNAi silencing of PctFL1-1 and PctFL1-2. *Planta* 235: 1239 – 1251.

Fujimoto, R., Sasaki, T., Inoue, H. & Nishio, T. (2008). Hypomethylation and transcriptional reactivation of retrotransposon-like sequences in ddm1 transgenic plants of *Brassica rapa*. *Plant Molecular Biology* 66: 463 – 473.

## G

Gadaleta, A., Giancaspro, A., Blechl, A.E. & Blanco, A. (2008). A transgenic durum wheat line that is free of marker genes and expresses 1Dy10. *Journal of Cereal Science* 48: 439 – 445.

Gambino, G., Gribaudo, I., Leopold, S., Scharl, A. & Laimer, M. (2005). Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes: I. *Plant Cell Reports* 24: 655 – 662.

Gambino, G., Chitarra, W., Maghuly, F., Laimer, M., Boccacci, P., Torello Marinoni, D. & Gribaudo, I. (2009) Characterization of T-DNA insertions in transgenic grapevines obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding* 24: 305 – 320.

Gamper, H.B., Parekh, H., Rice, M.C., Bruner, M., Youkey, H. & Kmiec, E.B. (2000). The DNA strand of chimeric RNA/DNA oligonucleotides can direct gene repair/conversion activity in mammalian and plant cell-free extracts. *Nucleic Acids Research* 28: 4332 – 4339.

Gangopadhyay, M., Chakraborty, D., Bhattacharyya, S. & Bhattacharya, S. (2010). Regeneration of transformed plants from hairy roots of *Plumbago indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 102: 109 – 114.

Gao, D.-Y., Vallejo, V.A., He, B., Gai, Y.-C. & Sun, L.-H. (2009). Detection of DNA changes in somaclonal mutants of rice using SSR markers and transposon display. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 98: 187 – 196.

Gao, H., Smith, J., Yang, M., Jones, S., Djukanovic, V., Nicholson, M.G., West, A., Bidney, D., Falco, S.C., Jantz, D. & Lyznik, L.A. (2010). Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *Plant Journal* 61: 176 – 187.

Ge, L., Chen, H., Jiang, J.F., Zhao, Y., Xu, M.L., Xu, Y.Y., Tan, K., Xu, Z. & Chong, K. (2004). Overexpression of OsRAA1 causes pleiotropic phenotypes in transgenic rice plants, including altered leaf, flower and root development and root response to gravity. *Plant Physiology* 135: 1502 – 1513.

Geier, T., Eimert, K., Scherer, R. & Nickel, C. (2008). Production and rooting behaviour of rolB-transgenic plants of grape rootstock 'Richter 110' (*Vitis berlandieri* X *V. rupestris*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94: 269 – 280.

Gelvin, S.B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 16 – 37.

Gelvin, S.B. (2008). *Agrobacterium*-mediated DNA transfer, and then some. *Nature Biotechnology* 26: 998 – 1000.

Germana, M.A. (2011a). Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Reports* 30: 839 – 857.

Germana, M.A. (2011b). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 104: 283 – 300.

Giddings, L. (2006). 'Cisgenic' as a product designation. *Nature Biotechnology* 24: 1329.

- Goldman, J.J., Hanna, W.W., Fleming, G.H. & Ozias-Akins, P. (2004). Ploidy variation among herbicide-resistant bermuda grass plants of cv. TifEagle transformed with the bar gene. *Plant Cell Reports* 22: 553 – 560.
- Golecki, B., Schulz, A., Carstens-Behrens, U. & Kollmann, R. (1998). Evidence for graft transmission of structural phloem proteins or their precursors in heterografts of Cucurbitaceae. *Planta* 206: 630 – 640.
- Gomez, G., Torres, H. & Pallas, V. (2005). Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system. *Plant Journal* 41: 107 – 116.
- Gomez, E., Zoth, S.C., Asurmendi, S., Rovere, C.V. & Berinstein, A. (2009). Expression of Hemagglutinin-Neuraminidase glycoprotein of Newcastle Disease Virus in agroinfiltrated *Nicotiana benthamiana* plants. *Journal of Biotechnology* 144: 337 – 340.
- Gossele, V.V., Fache, I.I., Meulewaeter, F., Cornelissen, M. & Metzlauff, M. (2002). SVISS – a novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco. *Plant Journal* 32: 859 – 866.
- Grimsley, N.H., Hohn, B., Hohn, T. & Walden, R. (1986). Agroinfection, an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83: 3282 – 3286.
- Gulick, P.J., Drouin, S., Yu, Z., Danyluk, J., Poisson, G., Monroy, A.F. & Sarhan, F. (2005). Transcriptome comparison of winter and spring wheat responding to low temperature. *Genome* 48: 913 – 923.
- Gutierrez-Campos, R., Torres-Acosta, J.A., Pérez-Martinez, J.D.J. & Gomez-Lim, M.A. (2001). Pleiotropic effects in transgenic tobacco plants expressing the oryzacystatin I gene. *HortScience* 36: 118 – 119.

## H

- Halford, N.G. (2012). Toward two decades of plant biotechnology: successes, failures, and prospects. *Food and Energy Security* 1: 9 – 28.
- Han, K.M., Dharmawardhana, P., Arias De Ares, R.S., Ma, C., Busov, V. & Strauss, S.H. (2011). Gibberellin-associated cisgenes modify growth, stature and wood properties in *Populus*. *Plant Biotechnology Journal* 9: 162 – 178.
- Haring, M.A. (2009). Novel breeding techniques: molecular biology combined with plant tissue culture. In: *EcoPB-ITAB, Strategies for a future without cell fusion techniques in varieties applied in Organic Farming* 27.-28. April 2009, Paris, France, pp. 25 – 28. [www.ecopb.org/fileadmin/ecopb/documents/Proceedings\\_Paris\\_090427.pdf](http://www.ecopb.org/fileadmin/ecopb/documents/Proceedings_Paris_090427.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).
- Haroldsen, V.M., Szczerba, M.W., Aktas, H., Lopez-Baltazar, J., Odias, M.J., Chi-Ham, C.L., Labavitch, J.M., Bennett, A.B. & Powell, A.L.T. (2012a). Mobility of transgenic nucleic acids and proteins within grafted rootstocks for agricultural improvement. *Frontiers in Plant Science* 3: 39.
- Haroldsen, V.M., Paulino, G., Chi-Ham, C.L. & Bennett, A.B. (2012b). Regulatory status of transgrafted plants is unclear. *California Agriculture* 66: 68 – 69.
- Harper, G., Hull, R., Lockhart, B. & Olszewski, N.E. (2002). Viral sequences integrated into plant genomes. *Annual Review of Phytopathology* 40: 119 – 136.
- Heeres, P., Schippers-Rozenboom, M., Jacobsen, E. & Visser, R.G.F. (2002). Transformation of a large number of potato varieties: genotype-dependent variation in efficiency and somaclonal variability. *Euphytica* 124: 13 – 22.
- Heilersig, B.H., Loonen, A.E., Janssen, E.M., Wolters, A.M. & Visser, R.G. (2006). Efficiency of transcriptional gene silencing of GBSSI in potato depends on the promoter region that is used in an inverted repeat. *Molecular Genetics and Genomics* 275: 437 – 449.
- Hemmer, C., Vigne, E., Goldschmidt, V., Komar, K., Marmonier, A., Valat, L., Demangeat, G., Vigneron, S., Masson, J.E. & Lemaire, O. (2009). Transgenic rootstocks expressing GFLV coat protein gene in a three years field trial; resistance assessment, impact on GFLV diversity and exchanges between rootstock and scion. [www.ogm.gouv.fr/IMG/pdf/133005885\\_cle84991d.pdf](http://www.ogm.gouv.fr/IMG/pdf/133005885_cle84991d.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

Hewezi, T., Alibert, G. & Kallerhoff, J. (2005). Local infiltration of high- and low-molecular-weight RNA from silenced sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants triggers posttranscriptional gene silencing in non-silenced plants. *Plant Biotechnology Journal* 3: 81 – 89.

Hirochika, H., Sugimoto, K., Otsuki, Y., Tsugawa, H. & Kanda, M. (1996). Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 7783 – 7788.

Hohn, B. & Puchta, H. (1999). Gene therapy in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 8321 – 8323.

Holme, I.B., Dionisio, G., Brinch-Pedersen, H., Wendt, T., Madsen, C.K., Vincze, E. & Holm, P. (2012). Cisgenic barley with improved phytase activity. *Plant Biotechnology Journal* 10: 237 – 247.

HSE (2005). Containment of GM plant viruses being developed as gene technology vectors. Research Report 378, Health and Safety Executive (HSE). [www.hse.gov.uk/research/rrpdf/rr378.pdf](http://www.hse.gov.uk/research/rrpdf/rr378.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

HSE (2007). The SACGM Compendium of guidance Part 4: Genetic modification work that involves plants (including plant-associated genetically modified microorganisms). Health and Safety Executive (HSE). [www.hse.gov.uk/biosafety/gmo/acgm/acgmcomp/part4.pdf](http://www.hse.gov.uk/biosafety/gmo/acgm/acgmcomp/part4.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

Hsu, C.Y., Liu, Y., Luthe, D.S. & Yuceer, C. (2006). Poplar FT2 shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering. *Plant Cell* 18: 1846 – 1861.

Huang, B. (1996). Gametoclonal variation in crop improvement. In: Jain, S.M., Sopory, S.K. & Veilleux, R.E. (eds), *In vitro haploid production in higher plants*, vol 2. Kluwer, Dordrecht, pp. 73 – 91.

## I

Iida, S. & Terada, R. (2005). Modification of endogeneous natural genes by gene targeting in rice and other higher plants. *Plant Molecular Biology* 59: 205 – 219.

## J

Jacobsen, E. & Karaba, N.N. (2008). Cisgenics – facilitating the second green revolution in India by improved traditional plant breeding. *Current Science* 94: 1365 – 1366.

Jacobsen, E. & Schouten, H.J. (2007). Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. *Trends in Biotechnology* 25: 219 – 223.

Jacobsen, E. & Schouten, H.J. (2008). Cisgenesis, a new tool for traditional plant breeding, should be exempted from the regulation on genetically modified organisms in a step by step approach. *Potato Research* 51: 75 – 88.

Jacobsen, E. & Schouten, H.J. (2009). Cisgenesis: an important sub-invention for traditional plant breeding companies. *Euphytica* 170: 235 – 247.

Jain, S.M. (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153 – 166.

Jiang, N., Bao, Z., Zhang, X., Eddy, S.R. & Wessler, S.R. (2004). Pack-MULE transposable elements mediate gene evolution in plants. *Nature* 431: 569–573

Jiang, C., Mithani, A., Gan, X., Belfield, E.J., Klingler, J.P., Zhu, J.-K., Ragoussis, J., Mott, R. & Harberd, N.P. (2011). Regenerant *Arabidopsis* lineages display a distinct genome-wide spectrum of mutations conferring variant phenotypes. *Current Biology* 21: 1385 – 1390.

Jones, A.L., Thomas, C.L. & Maule, A.J. (1998). De novo methylation and cosuppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. *EMBO Journal* 17: 6385 – 6393.

Joosen, R.V.L., Lammers, M., Balk, P.A., Bronnum, P., Konings, M., Perks, M., Stattin, E., Van Wordragen, M.F. & van der Geest, A.H.M. (2006). Correlating gene expression to physiological parameters and environmental conditions during cold acclimation of *Pinus sylvestris*, identification of molecular markers using cDNA microarrays. *Tree Physiology* 26: 1297 – 1313.

Joshi, S.G., Schaart, J.G., Groenwold, R., Jacobsen, E., Schouten, H.J. & Krens, F.A. (2011). Functional analysis and expression profiling of HcrVf1 and HcrVf2 for development scab resistant cisgenic and intragenic apples. *Plant Molecular Biology* 75: 579 – 591.

JRC (2012). GMO Register. Joint Research Centre (JRC), Institute for Health and Consumer Protection. European Commission. <http://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/> (zuletzt besucht am 26. April 2012).

## **K**

Kanazawa, A., Inaba, J.-i., Shimura, H., Otagaki, S., Tsukahara, S., Matsuzawa, A., Kim, B.M., Goto, K. and Masuta, C. (2011a). Virus-mediated efficient induction of epigenetic modifications of endogenous genes with phenotypic changes in plants. *Plant Journal* 65: 156 – 168.

Kanazawa, A., Inaba, J., Kasai, M., Shimura, H. & Masuta, C. (2011b). RNA-mediated epigenetic modifications of an endogenous gene targeted by a viral vector: a potent gene silencing system to produce a plant that does not carry a transgene but has altered traits. *Plant Signaling Behavior* 6: 1090 – 1093.

Kasai, A., Bai, S., Li, T. & Harada, T. (2011). Graft-transmitted siRNA signal from root induces visual manifestation of endogenous post transcriptional gene silencing in the scion. *PLoS ONE*: e16895.

Keller, H. (2002). Kommentar zum Umweltschutzgesetz. Schulthess, Zürich.

Kim, S. & Kim, J.-S. (2011). Targeted genome engineering via zinc finger nucleases. *Plant Biotechnology Reports* 5: 9 – 17.

Kim, M., Canio, W., Kessler, S. & Sinha, N. (2001). Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science* 293: 287 – 289.

Kim, S.R., Lee, J., Jun, S.H., Park, S., Kang, H.G., Kwon, S. & An, G. (2003). Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants. *Plant Molecular Biology* 52: 761 – 773.

Kim, C.G., Lee, B., Kim, D.I., Park, J.E., Kim, H.J., Park, K.W., Yi, H., Jeong, S.C., Yoon, W.K., Harn, C.H. & Kim, H.M. (2008). Detection of gene flow from GM to non-GM watermelon in a field trial. *Journal of Plant Biology* 51: 74 – 77.

King, G.J., Amoah, S. & Kurup, S. (2010). Exploring and exploiting epigenetic variation in crops. *Genome* 53: 856 – 868.

Kmiec, E.B., Johnson, C. & May, G.D. (2001). Chloroplast lysates support directed mutagenesis via modified DNA and chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Plant Journal* 27: 267 – 274.

Kochevenko, A. & Willmitzer, L. (2003). Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-based site-specific modification of the tobacco acetolactate synthase gene. *Plant Physiology* 132: 174 – 184.

Kohli, A., Twyman, R.M., Abranches, A., Wegel, E., Shaw, P., Christou, P. & Stoger, E. (2003). Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Molecular Biology* 52: 247 – 258.

Kohli, A., Miro, B. & Twyman, R.M. (2010). Transgene integration, expression and stability in plants: strategies for improvements. In: Kole, C., Michler, C.H., Abbott, A.G. & Hall, T.C. (eds.), *Biotech Plants. Volume 1: Concepts & Development*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 201 – 238.

Kok, E.J., Keijer, J., Kleter, G.A. & Kuiper, H.A. (2008). Comparative safety assessment of plant-derived foods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 50: 98 – 113.

Komarova, T.V., Baschieri, S., Donini, M., Marusic, C., Benvenuto, E. & Dorokhov, Y.L. (2010). Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. *Expert Review of Vaccines* 9: 859 – 876.

Kononov, M. E., Bassuner, B., & Gelvin, S.B. (1997). Integration of T-DNA binary vector backbone sequences into the tobacco genome: Evidence for multiple complex pattern of integration. *Plant Journal* 11: 945 – 957.

Kotoda, N., Iwanami, H., Takahashi, S. & Abe, K. (2006). Antisense expression of MdTFL1, a TFL1-like gene, reduces the juvenile phase in apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131: 74 – 81.

Krastanova, S.V., Balaji, V., Holden, M.R., Sekiya, M., Xue, B., Momol, E.A. & Burr, T.J. (2010). Resistance to crown gall disease in transgenic grapevine rootstocks containing truncated virE2 of *Agrobacterium*. *Transgenic Research* 19: 949 – 958.

Krens, A.F. (2005). Classification of genetically modified crops. Report commissioned by COGEM. Business Unit Biodiversity and Breeding Plant Research International, Wageningen. [www.cogem.net/index.cfm/nl/publicaties/publicatie/classification-of-genetically-modified-crops](http://www.cogem.net/index.cfm/nl/publicaties/publicatie/classification-of-genetically-modified-crops) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

Krizova, K., Fojtova, M., Depicker, A. & Kovarik, A. (2009). Cell culture-induced gradual and frequent epigenetic reprogramming of invertedly repeated tobacco transgene epialleles. *Plant Physiology* 149: 1493 – 1504.

Kudo, H. & Harada, T. (2007). A graft-transmissible RNA from tomato rootstock changes leaf morphology of potato scion. *Hortscience* 42: 225 – 226.

Kumagai, M.H., Donson, J., della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K. & Grill, L.K. (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 1679 – 1683.

Kuzma, J. & Kokotovich, A. (2011). Renegotiating GM crop regulation. *EMBO Reports* 12: 883 – 888.

## L

Labra, M., Savini, C., Bracale, M., Pelucchi, N., Colombo, L., Bardini, M. & Sala, F. (2001). Genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced by infecting calli with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 20: 325 – 330.

Lai J., Li, Y., Messing, J. & Dooner, H.K. (2005). Gene movement by Helitron transposons contributes to the haplotype variability of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 9068 – 9073.

Lal, S.K. & Hannah, L.C. (2005). Helitrons contribute to the lack of gene colinearity observed in modern maize inbreds. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 9993 – 9994.

Lammerts van Bueren, E.T., Verhoog, H., Tiemens-Hulscher, M., Struik, P.C. & Haring, M.A. (2007). Organic agriculture requires process rather than product evaluation of novel breeding techniques. *NJAS Wageningen Journal of Life Sciences* 54: 401 – 412.

Lammerts van Bueren, E.T., Tiemens-Hulscher, M. & Struik, P.C. (2008). Cisgenesis does not solve the late blight problem of organic potato production: alternative breeding strategies. *Potato Research* 51: 89 – 99.

Lange, M., Vincze, E., Moller, M. J., & Holm, P. B. (2006). Molecular analysis of transgene and vector backbone integration into the barley genome following *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports* 25: 815 – 820.

Latham, J.R., Wilson, A.K. & Steinbrecher, R.A. (2006). The mutational consequences of plant transformation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 6: 1 – 7.

Le Roux, P., Flachowsky, H., Hanke, M.-V., Gessler, C. & Patocchi, A. (2012). Use of transgenic early flowering approach in apple (*Malus x domestica* Borkh.) to introgress fire blight resistance from cultivar Evereste. *Molecular Breeding* 30: 857 – 874.

Leckie, B.M. & Stewart, C.N. (2011). Agroinfiltration as a technique for rapid assays for evaluating candidate insect resistance transgenes in plants. *Plant Cell Reports* 30: 325 – 334.

Ledford, H. (2011). Transgenic grass skirts regulators. *Nature* 475: 274 – 275.

Lewis, R.S. & Kernodle, S.P. (2009). A method for accelerated trait conversion in plant breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 118: 1499 – 1508.

Li, F., Papworth, M., Minczuk, M., Rohde, C., Zhang, Y., Ragozin, S. & Jeltsch, A. (2007). Chimeric DNA methyltransferases target DNA methylation to specific DNA sequences and repress expression of target genes. *Nucleic Acids Research* 35: 100 – 112.



- Li, T., Huang, S., Jiang, W.Z., Wright, D., Spalding, M.H., Weeks, D.P. & Yang, B. (2011). TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Research* 39: 359 – 372.
- Li, T., Liu, B., Spalding, M.H., Weeks, D.P. & Yang, B. (2012). High efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature Biotechnology* 30: 390 – 392.
- Liu, H., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Xie, J., Cheng, J., Peng, Y., Ghabrial, S.A. & Yi, X. (2010a). Widespread horizontal gene transfer from double-stranded RNA viruses to eukaryotic nuclear genomes. *Journal of Virology* 84: 11876 – 11887.
- Liu, Y.-S., Wang, Q.L. & Li, B.-Y. (2010b). New insights into plant graft hybridization. *Heredity* 104: 1 – 2.
- Lloyd, A., Plaisier, C.L., Carroll, D. & Drews, G.N. (2005). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 2232 – 2237.
- Lusser, M. & Rodriguez-Cerezo, E. (2012). Comparative regulatory approaches for new plant breeding techniques. Workshop Proceedings. European Commission, Joint Research Centre (JRC). JRC Report, EUR 25237 EN. <http://ipts.jrc.ec.europa.eu/publications/pub.cfm?id=4959> (zuletzt besucht am 19. September 2012).
- Lusser, M., Parisi, C., Plan, D. & Rodriguez-Cerezo, E. (2011). New plant breeding techniques: State-of-the-art and prospects for commercial development. European Commission, Joint Research Centre (JRC). JRC Report, EUR 24760 EN. <http://ftp.jrc.es/EURdoc/JRC63971.pdf> (zuletzt besucht am 19. September 2012).
- Lusser, M., Parisi, C., Plan, D. & Rodriguez-Cerezo, E. (2012). Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nature Biotechnology* 30: 231 – 239.

## M

- Mahfouz, M. & Li, L. (2011) TALE nucleases and next generation GM crops. *GM Crops* 2: 99 – 103.
- Mahfouz, M.M., Li, L., Shamimuzzaman, M., Wibowo, A., Fang, X. & Zhu, J.K. (2011). De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108: 2623 – 2628.
- Majumdar, S., Garai, S. & Jha, S. (2011). Genetic transformation of *Bacopa monniera* by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of bacopa saponins in transformed calli and plants. *Plant Cell Reports* 30: 941 – 954.
- Manimaran, P., Ramkumar, G., Sakthivel, K., Sundaram, R.M., Madhav, M.S. & Balachandran, S.M. (2011). Suitability of non-lethal marker and marker-free systems for development of transgenic crop plants: Present status and future prospects. *Biotechnology Advances* 29: 703 – 714.
- Manning, K., Tor, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A.J., Giovannoni, J.J. & Seymour, G.B. (2006). A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics* 38: 948 – 952.
- Marimuthu, M.P.A., Jolivet, S., Ravi, M., Pereira, L., Davda, J.N., Cromer, L., Wang, L., Nogué, F., Chan, S.W.L., Siddiqi, I. & Mercier, R. (2011). Synthetic clonal reproduction through seeds. *Science* 331: 876.
- Marti, R., Cubero, J., Daza, A., Piquer, J., Salcedo, C.I., Morente, C. & Lopez, M.M. (1999). Evidence of migration and endophytic presence of *Agrobacterium tumefaciens* in rose plants. *European Journal of Plant Pathology* 105: 39 – 50.
- Marton, I., Zuker, A., Shklarman, E., Zeevi, V., Tovkach, A., Roffe, S., Ovadis, M., Tzfira, T. & Vainstein, A. (2010). Nontransgenic genome modification in plant cells. *Plant Physiology* 154: 1079 – 1087.
- Matsuda, N., Ikeda, K., Kurosaka, M., Isuzugawa, K., Endo, T., Omura, M. & Takashina, T. (2006). In vitro flowering on transgenic pears (*Pyrus communis* L.) expressing CiFT, a Citrus ortholog of the *Arabidopsis* FT

gene. Abstract Book of the 3rd Intl. Rosaceae Genomics Conf., 19-20 March, 2006, 45. ISHS, Napier, New Zealand.

Matzke, M.A., Kanno, T., Huettel, B., Daxinger, L. & Matzke, A.J.M. (2007). Targets of RNA-directed DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 512 – 519.

McNamara, A.R., Hurd, P.J., Smith, A.E. & Ford, K.G. (2002) Characterisation of site-biased DNA methyltransferases: specificity, affinity and subsite relationships. *Nucleic Acids Research* 30: 3818 – 3830.

Menassa, R., Ahmad, A. & Joensuu, J.J. (2012). Transient expression using Agroinfiltration and its applications in molecular farming. In: Wang, A. & Ma, S. (eds.), *Molecular farming in plants: recent advances and future prospects*. Springer, Heidelberg, London, New York, pp. 183 – 198.

Messmer, M. (2011). Dossier zur Beschreibung und Beurteilung von Züchtungsmethoden für den ökologischen Landbau. Forschungsinstitut für biologischen Landbau, Frick. [www.fibl.org/fileadmin/documents/de/news/2011/messmer-2011-zuechtungsmethoden.pdf](http://www.fibl.org/fileadmin/documents/de/news/2011/messmer-2011-zuechtungsmethoden.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

Mezhevaya, K., Winters, T.A. & Neumann, R.D. (1999). Gene targeted DNA double-strand break induction by (125)I-labeled triplex-forming oligonucleotides is highly mutagenic following repair in human cells. *Nucleic Acids Research* 27: 4282 – 4290.

Miguel, C. & Marum, L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany* 62: 3713 – 3725.

Minczuk, M., Papworth, M.A., Kolasinska, P., Murphy, M.P. & Klug, A. (2006). Sequence-specific modification of mitochondrial DNA using a chimeric zinc finger methylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 19689 – 19694.

Mishiba, K., Nishihara, M., Abe, Y., Nakatsuka, T., Kawamura, H., Komada, K., Takesawa, T., Abe, J., & Yamamura, S. (2006). Production of dwarf potted gentian using wild-type *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Biotechnology* 23: 33 – 38.

Molesini, B., Pii, Y. & Pandolfini, T. (2012). Fruit improvement using intragenesis and artificial microRNA. *Trends in Biotechnology* 30: 80 – 88.

Molnar, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R. & Baulcombe, D.C. (2010). Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328: 872 – 875.

Morbitzer, R., Römer, P., Boch, J. & Lahaye, T. (2010). Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 21617 – 21622.

Mori, S., Oka, E., Umehara, H., Suzuki, S., Kobayashi, H., Hoshi, Y., Kondo, M., Koike, Y. & Nakano, M. (2007). Somaclonal variation and stability of GUS gene expression in transgenic agapanthus (*Agapanthus praecox* ssp *orientalis*) plants at the flowering stage. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 43: 79 – 87.

Moscou, M.J. & Bogdanove, A.J. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*: 326: 1501.

Mussolino C., Morbitzer R., Lütge F., Dannemann N. Lahaye T. & Cathomen T. (2011). A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Research* 39: 9283 – 9293.

Myskja, B.K. (2006). The moral difference between intragenic and transgenic modification of plants. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 19: 225 – 238.

## **N**

Nagel, A.K., Kalariya, H. & Schnabel, G. (2010). The *Gastrodia* antifungal protein (GAFP-1) and its transcripts are absent from scions of chimeric-grafted plum. *HortScience* 45: 188 – 192.

Nap, J.-P. (2010). Epigenetic modulation of gene activity as new challenge for GMO risk assessments. Symposium on Contributions from scientific research to the risk assessment of GMOs, 21-22 October 2010, Brussels, Belgium. [www.biosafety.be/ERA2010/post\\_symposium/101221\\_Compilation\\_abstracts.pdf](http://www.biosafety.be/ERA2010/post_symposium/101221_Compilation_abstracts.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

Nap, J.-P. & van Kessel, A. G. (2006). Epigenetics in context. Report commissioned by The Netherlands Commission on Genetic Modification (COGEM). [www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/epigenetics-in-context](http://www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/epigenetics-in-context) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

Nap, J.-P. & van Kessel, A. G. (2011). Epigenetics, an update. Report commissioned by The Netherlands Commission on Genetic Modification (COGEM). [www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/epigenetics-un-update](http://www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/epigenetics-un-update) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

Neelakandan, A.K. & Wang, K. (2012). Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Reports* 31: 597 – 620.

Notaguchi, M., Abe, M., Kimura, T., Daimon, Y., Kobayashi, T., Yamaguchi, A., Tomita, Y., Dohi, K., Mori, M. & Araki, T. (2008). Long-distance, graft-transmissible action of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. *Plant Cell Physiology* 49: 1645 – 1658.

NTWG (2011). Final Report. New Techniques Working Group (NTWG). *Noch nicht veröffentlicht.*

## O

Oh, T.J. & May, G.D. (2001). Oligonucleotide-directed plant gene targeting. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 169 – 172.

Okano, Y., Miki, D. & Shimamoto, K. (2008). Small interfering RNA (siRNA) targeting of endogenous promoters induces DNA methylation, but not necessarily gene silencing, in rice. *Plant Journal* 53: 65 – 77.

Okuzaki, A. & Toriyama, K. (2004). Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Reports* 22: 509 – 512.

Olhoft, P.M., Flaye, L.E. & Sowers, D.A. (2004). T-DNA locus structure in a large population of soyabean plant transform using the Agrobacterium-mediated cotyledonary-node methods. *Plant Biotechnology Journal* 2: 289 – 300.

Osakabe, K., Osakabe, Y. & Toki, S. (2010). Site-directed mutagenesis in Arabidopsis using custom-designed zinc finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 12034 – 12039.

Otagaki, S., Kawai, M., Masuta, C. & Kanazawa, A. (2011) Size and positional effects of promoter RNA segments on virus-induced RNA-directed DNA methylation and transcriptional gene silencing. *Epigenetics* 6: 681 – 691.

## P

Park, S.M., Lee, J.S., Jegal, S., Jeon, B.Y., Jung, M., Park, Y.S., Han, S.L., Shin, Y.S., Her, N.H., Lee, J.H., Lee, M.Y., Ryu, K.H., Yang, S.G. & Harn, C.H. (2005). Transgenic watermelon rootstock resistant to CGMMV (cucumber green mottle mosaic virus) infection. *Plant Cell Reports* 24: 350 – 356.

Park, T.H., Vleeshouwers, V.G.A.A., Jacobsen, E., Van Der Vossen, E. & Visser, R.G.F. (2009). Molecular breeding for resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato (*Solanum tuberosum* L.): a perspective of cisgenesis. *Plant Breeding* 128: 109 – 117.

Pena, L., Martin-Trillo, M., Juarez, J., Pina, J.A., Navarro, L. & Martinez-Zapater, J.M. (2001). Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nature Biotechnology* 19: 263 – 267.

Permyakova, N.V., Shumnyi, V.K. & Deineko, E.V. (2009). Agrobacterium-mediated transformation of plants: Transfer of vector DNA fragments in the plant genome. *Russian Journal of Genetics* 45: 266 – 275.

Petti, C., Wendt, T., Meade, C., & Mullins, E. (2009). Evidence of genotype dependency within *Agrobacterium tumefaciens* in relation to the integration of vector backbone sequence in transgenic *Phytophthora infestans*-tolerant potato. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107: 301 – 306.

Pioneer (2012). Seed Production Technology (SPT) Process. [www.pioneer.com/pv\\_obj\\_cache/pv\\_obj\\_id\\_4049B534A4E66B9A4A9FCC2E44465690C00F1000/filename/Tech\\_SPT\\_2012.pdf](http://www.pioneer.com/pv_obj_cache/pv_obj_id_4049B534A4E66B9A4A9FCC2E44465690C00F1000/filename/Tech_SPT_2012.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

Pogue, G.P., Vojdani, F., Palmer, K.E., Hiatt, E., Hume, S., Phelps, J., Long, L., Bohorova, N., Kim, D., Pauly, M., Velasco, J., Whaley, K., Zeitlin, L., Garger, S.J., White, E., Bai, Y., Haydon, H. & Bratcher, B. (2010). Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. *Plant Biotechnology Journal* 8: 638 – 654.

Porteus, M.H. (2009). Plant biotechnology: zinc fingers on target. *Nature* 459: 337 – 338.

Porteus, M.H. & Carroll, D. (2005). Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nature Biotechnology* 23: 967 – 973.

Prigge, V., Xu, X., Li, L., Babu, R., Chen, S., Atlin, G.N. & Melchinger, A.E. (2012). New insights into the genetics of in vivo induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. *Genetics* 190: 781 – 793.

Prins, T.W. & Kok, E.J. (2010). Food and feed safety aspects of cisgenic crop plant varieties. RIKILT-Institute of Food Safety Wageningen University & Research Centre. <http://edepot.wur.nl/157733> (zuletzt besucht am 19. September 2012).

Puchta, H. & Hohn, B. (2010). Breaking news: Plants mutate right on target. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 11657 – 11658.

Puopolo, G., Raio, A. & Zoina, A. (2007). Early detection of *Agrobacterium tumefaciens* in symptomless artificially inoculated chrysanthemum and peach plants using PCR. *Journal of Plant Pathology* 89: 185 – 190.

Purkayastha, A. & Dasgupta, I. (2009). Virus-induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 967 – 976.

## **R**

Ravel, C., Martre, P., Romeuf, I., Dardevet, M., El-Malki, R., Bordes, J., Duchateau, N., Brunel, D., Balfourier, F. & Charmet, G. (2009). Nucleotide polymorphism in the wheat transcriptional activator *Spa* influences its pattern of expression and has pleiotropic effects on grain protein composition, dough viscoelasticity, and grain hardness. *Plant Physiology* 151: 2133 – 2144.

Ravi, M. & Chan, S.W.L. (2010). Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* 464: 615 – 618.

Reardon, S. (2011). EPA proposal would exempt some GMOs from registry. *Science* 332: 652.

Rhee, Y., Sekhon, R.S., Chopra, S. & Kaeppler, S. (2010). Tissue culture-induced novel epialleles of a Myb transcription factor encoded by *pericarp color1* in Maize. *Genetics* 186: 843 – 855.

Rice, M.C., May, G.D., Kipp, P.B., Parekh, H. & Kmiec, E.B. (2000). Genetic repair of mutations in plant cellfree extracts directed by specific chimeric oligonucleotides. *Plant Physiology* 123: 427 – 437.

Ricroch, A. E., Berge, J. B. & Kuntz, M. (2011). Evaluation of genetically engineered crops using transcriptomic, proteomic, and metabolomic profiling techniques. *Plant Physiology* 155: 1752 – 1761.

Robertson, D. (2004). VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annual Review of Plant Biology* 55: 495 – 519.

Rommens, C.M. (2004) All-native DNA transformation: a new approach to plant genetic engineering. *Trends in Plant Science* 9: 457 – 464.

- Rommens, C.M. (2007). Intragenic crop improvement: combining the benefits of traditional breeding and genetic engineering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4281 – 4288.
- Rommens, C.M. (2010). Barriers and paths to market for genetically engineered crops. *Plant Biotechnology Journal* 8: 101 – 111.
- Rommens, C.M., Humara, J.M., Ye, J., Yan, H., Richael, C., Zhang, L., Perry, R. & Swords, K. (2004). Crop improvement through modification of the plant's own genome. *Plant Physiology* 135: 421 – 431.
- Rommens, C.M., Bougri, O., Yan, H., Humara, J.M., Owen, J., Swords, K. & Ye, J. (2005). Plant-derived transfer DNAs. *Plant Physiology* 139: 1338 – 1349.
- Rommens, C.M., Ye, J.S., Richael, C. & Swords, K. (2006). Improving potato storage and processing characteristics through all-native DNA transformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9882 – 9887.
- Rommens, C.M., Haring, M.A., Swords, K., Davies, H.V. & Belknap, W.R. (2007). The intragenic approach as a new extension to traditional plant breeding. *Trends in Plant Science* 12: 397 – 403.
- Rommens, C.M., Yan, H., Swords, K., Richael, C. & Ye, J.S. (2008). Low-acrylamide French fries and potato chips. *Plant Biotechnology Journal* 6: 843 – 853.
- Rommens, C.M., Conner, A., Yan, H. & Hanley, Z. (2011). Intragenic vectors and marker-free transformation tools for a greener biotechnology. *In: Stewart, C.N., Touraev, A. Citovsky, V. & Tzfira, T. (eds.), Plant Transformation Technologies*. Wiley-Blackwell, Ames, IA, pp. 93 – 107.
- Rosati, A., Bogani, P., Santarlasci, L. & Buiatti, M. (2008). Characterisation of 3' transgene insertion site and derived mRNAs in MON810 YieldGard maize. *Plant Molecular Biology* 67: 271 – 281.
- Rosellini, D. (2011). Selectable marker genes from plants: reliability and potential. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 47: 222 – 233.
- Ruiter, R., Van Den Brande, I., Stals, E., Delaure, S., Cornelissen, M. & D'Halluin, K. (2003). Spontaneous mutation frequency in plants obscures the effect of chimera-plasty. *Plant Molecular Biology* 53: 715 – 729.
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cbzares, B. & Lucas, W.J. (1999). Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: Implications for supracellular regulation in plants. *Development* 126: 4405 – 4419.
- Rusk, N. (2009). Grafting as a potent molecular tool. *Nature Methods* 6: 484.
- Russel, A.W. & Sparrow, R. (2008). The case for regulating intragenic GMOs. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 21: 153 – 181.
- Ryu, C.-M., Anand, A., Kang, L. & Mysore, K.S. (2004). Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse solanaceous species. *Plant Journal* 40: 322 – 331.

## **S**

- Saika, H. & Toki, S. (2011). Gene targeting applied to designed-mutation breeding of high-tryptophan rice. *ISB News Report* December 2011. [www.isb.vt.edu/news/2011/Dec/GeneTargeting.pdf](http://www.isb.vt.edu/news/2011/Dec/GeneTargeting.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).
- Saika, H., Oikawa, A., Matsuda, F., Onodera, H., Saito, K. & Toki, S. (2011). Application of gene targeting to designed mutation breeding of high-tryptophan rice. *Plant Physiology* 156: 1269 – 1277.
- Sala, F., Arencibia, A., Castiglione, S., Yifan, H., Labra, M., Savini, C., Bracale, M. & Pelucchi, N. (2000). Somaclonal variation in transgenic plants. *Acta Horticulturae* 530: 411 – 419.
- Salomon, S. & Puchta, H. (1998). Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *EMBO Journal* 17: 6086 – 6095.
- Sarkar, D., Sharma, S., Chandel, P. & Pandey S.K. (2010). Evidence for gametoclonal variation in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Growth Regulation* 61: 109 – 117.

- Sasaki, S., Yamagishi, N. & Yoshikawa, N. (2011). Efficient virus-induced gene silencing in apple, pear and Japanese pear using Apple latent spherical virus vectors. *Plant Methods* 7: 15.
- Saxena, G., Banerjee, S., Rahman, L., Verma, P.C., Mallavarapu, G.R. & Kumar, S. (2007). Rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) generated by *Agrobacterium rhizogenes* mediated Ri insertion for improve essential oil quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 215 – 223.
- Schaart, J.G. (2004). Towards consumer-friendly cisgenic strawberries which are less susceptible to *Botrytis cinerea*. Ph.D. thesis, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands. <http://edepot.wur.nl/121605> (zuletzt besucht am 19. September 2012).
- Schaart J.G. & Visser, R.G.F. (2009). Novel Plant Breeding Techniques - Consequences of new genetic modification-based plant breeding techniques in comparison to conventional plant breeding. COGEM Research Report number 2009-02. The Netherlands Commission on Genetic Modification. [www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/novel-plant-breeding-techniques](http://www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/novel-plant-breeding-techniques) (zuletzt besucht am 19. September 2012).
- Schouten, H.J., Krens, F.A. & Jacobsen, E. (2006a). Do cisgenic plants warrant less stringent oversight? *Nature Biotechnology* 24: 753.
- Schouten, H.J., Krens, F.A. & Jacobsen, E. (2006b). Reply to: 'Cisgenic' as a product designation. *Nature Biotechnology* 24: 1331 – 1333.
- Schouten, H.J., Krens, F.A. & Jacobsen, E. (2006c). Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO Reports* 7: 750 – 753.
- Schubert, D. & Williams, D. (2006). 'Cisgenic' as a product designation. *Nature Biotechnology* 24: 1327 – 1328.
- Segui-Simarro, J.M., Corral-Martínez, P., Parra-Vega, V. & González-García, B. (2011). Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Reports* 30: 765 – 778.
- Senthil-Kumar, M. & Mysore, K.S. (2011a). Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *Plant Biotechnology Journal* 9: 797 – 806.
- Senthil-Kumar, M. & Mysore, K.S. (2011b). New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends in Plant Science* 16: 656 – 665.
- Shibukawa, T., Yazawa, K., Kikuchi, A. & Kamada, H. (2009). Possible involvement of DNA methylation on expression regulation of carrot LEC1 gene in its 5'-upstream region. *Gene* 437: 22 – 31.
- Shibuya, K., Fukushima, S. & Takatsuji, H. (2009). RNA-directed DNA methylation induces transcriptional activation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 1660 – 1665.
- Shukla, V.K., Doyon, Y., Miller, J.C., DeKever, R.C., Moehle, E.A., Worden, S.E., Mitchell, J.C., Arnold, N.L., Gopalan, S., Meng, X., Choi, V.M., Rock, J.M., Wu, Y.-Y., Katibah, G.E., Zhifang, G., McCaskill, D., Simpson, M.A., Blakeslee, B., Greenwalt, S.A., Butler, H.J., Hinkley, S.J., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D. & Urnov, F.D. (2009). Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459: 437 – 441.
- Sijen, T., Vijn, I., Rebocho, A., van Blokland, R., Roelofs, D., Mol, J.N. & Kooter, J.M. (2001) Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Current Biology* 11: 436 – 440.
- Singh, G. & Shetty, S. (2011). Impact of tissue culture on agriculture in India. *Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering* 1: 147 – 158.
- Smith N., Kilpatrick J.G. & Whitelam G.C. (2001). Superfluous transgene integration in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 20: 215 – 249.
- Smith, A.E., Hurd, P.J., Bannister, A.J., Kouzarides, T. & Ford, K.G. (2008). Heritable gene repression through the action of a directed DNA methyltransferase at a chromosomal locus. *Journal of Biological Chemistry* 283: 9878 – 9885.

- Smolka, A., Li, X.Y., Heikelt, C., Welander, M. & Zhu, L.-H. (2010). Effects of transgenic rootstocks on growth and development of non-transgenic scion cultivars in apple. *Transgenic Research* 19: 933 – 948.
- Somers, D.A. & Makarevitch, I. (2004). Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes? *Current Opinion in Biotechnology* 15: 126 – 131.
- Srinivasan, C., Dardick, C., Callahan, A. & Scorza, R. (2012). Plum (*Prunus domestica*) trees transformed with Poplar FT1 result in altered architecture, dormancy requirement, and continuous flowering. *PLoS ONE* 7: e40715.
- Stegemann, S. & Bock, R. (2009). Exchange of genetic material between cells in plant tissue grafts. *Science* 324: 649 – 651.
- Stegemann, S., Keuthe, M., Greiner, S. & Bock, R. (2012). Horizontal transfer of chloroplast genomes between plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109: 2434 – 2438.
- Stower, H. (2012). Breeding vigour backwards. *Nature Reviews Genetics* 13: 300.
- Stratmann, J.W. & Hind S.R. (2011). Gene silencing goes viral - and uncovers the private life of plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 140: 91 – 102.
- Swanson-Wagner, R.A., Jia, Y., DeCook, R., Borsuk, L.A., Nettleton, D. & Schnable, P.S. (2006). All possible modes of gene action observed in a global comparison of gene expression in a maize F1 hybrid and its inbred parents. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 6805 – 6810.
- Swanson-Wagner, R.A., DeCook, R., Jia, Y., Bancroft, T., Ji, T., Zhao, X., Nettleton, D. & Schnable P.S. (2009). Paternal dominance of trans-eQTL influences gene expression patterns in maize hybrids. *Science* 326: 1118 – 1120.
- Szankowski I., Waidmann S., Degenhardt J., Patocchi A., Silfverberg-Dilworth E., Broggin G. & Gessler C. (2009). Highly scab resistant transgenic apple lines achieved by introgression of HcrVf2 controlled by different native promoter lengths. *Tree Genomics and Genomes* 5: 349 – 358.

## T

- Tait, J. & Barker, G. (2011). Global food security and the governance of modern biotechnologies. *EMBO Reports* 12: 763 – 768.
- Tang, Y., Wang, F., Zhao, J., Xie, K., Hong, Y. & Liu, Y. (2010). Virus-based microRNA expression for gene functional analysis in plants. *Plant Physiology* 153: 632 – 641.
- Tarbah, F. & Googman, R.N. (1987). Systemic spread of *Agrobacterium tumefaciens* biovar-3 in the vascular system of grapes. *Phytopathology* 77: 915 – 920.
- Terada, R., Nagahara, M., Furukawa, K., Shimamoto, M., Yamaguchi, K. & Iida, S. (2010). Cre-loxP mediated marker elimination and gene reactivation at the waxy locus created in rice genome based on strong positive-negative selection. *Plant Biotechnology* 27: 29 – 37.
- Thompson, A., Barry, C., Jarvis, M., Vrebalov, J., Giovannoni, J., Grierson, D. & Seymour, G. (1999). Molecular and genetic characterization of a novel pleiotropic tomato-ripening mutant. *Plant Physiology* 120: 383 – 389.
- Thyssen, G., Svab, Z. & Maliga, P. (2012). Cell-to-cell movement of plastids in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109: 2439 – 2443.
- Tournier, B., Tabler, M. & Kalantidis, K. (2006). Phloem flow strongly influences the systemic spread of silencing in GFP *Nicotiana benthamiana* plants. *Plant Journal* 47: 383 – 394.
- Tovkach, A., Zeevi, V. & Tzfira, T. (2009). A toolbox and procedural notes for characterizing novel zinc finger nucleases for genome editing in plant cells. *Plant Journal* 57: 747 – 757.
- Townsend, J.A., Wright, D.A., Winfrey, R.J., Fu, F., Maeder, M.L., Joung, J.K. & Voytas, D.F. (2009). High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature* 459: 442 – 446.

Tränkner, C., Lehmann, S., Hoenicka, H., Hanke, M.-V., Fladung, M., Lenhardt, D., Dunemann, F., Gau, A., Schlangen, K., Lamnoy, M. & Flachowsky, H. (2010). Over-expression of an FT-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta* 232: 1309 – 1324.

Tuteja, N., Verma, S., Sahoo, R.K., Raveendar, S. & Reddy, I.N. (2012). Recent advances in development of marker-free transgenic plants: Regulation and biosafety concern. *Journal of Biosciences* 37: 167 – 197.

Tzfira, T., Frankmen, L., Vaidya, M. & Citovsky, V. (2003). Sitespecific integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA via double-stranded intermediates. *Plant Physiology* 133: 1011 – 1023.

Tzfira, T., Weinthal, T., Marton, I., Zeevi, V., Zuker, A. & Vainstein, A. (2012). Genome modifications in plant cells by custom-made restriction enzymes. *Plant Biotechnology Journal* 10: 373 – 389.

## U

Uauy, C., Brevis, J.C. & Dubcovsky, J. (2006). The high grain protein content gene *Gpc-B1* accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat. *Journal of Experimental Botany* 57: 2785 – 2794.

Ülker, B., Li, Y., Rosso, M.G., Logemann, E., Somssich, I.E. & Weissbar B. (2008). T-DNA-mediated transfer of *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal DNA into plants. *Nature Biotechnology* 26: 1015 – 1017.

Unver, T. & Budak, H. (2009). Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene silencing method. *International Journal of Plant Genomics* Article ID 198680.

Upadhyaya, C.P., Nookaraju, A., Gururani, M.A., Kim, D.-H., Upadhyaya, D.C., Chun, S.C. & Park, S.W. (2010). An update on the progress towards the development of marker-free transgenic plants. *Botanical Studies* 51: 277 – 292.

Urnov, F.D., Rebar, E.J., Holmes, M.C., Zhang, H.S. & Gregory, P.D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics* 11: 636 – 646.

USDA (2011). Pioneer Hi-Bred International, Inc. Seed Production Technology (SPT) Process DP-32138-1 Corn. Final Environmental Assessment. United States Department of Agriculture (USDA). [www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/08\\_33801p\\_fea.pdf](http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/08_33801p_fea.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

USDA (2012). Petitions for nonregulated status granted or pending by APHIS. [www.aphis.usda.gov/biotechnology/status.shtml](http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/status.shtml) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

## V

Vainstein, A., Marton, I., Zuker, A., Danziger, M. & Tzfira T. (2011). Permanent genome modifications in plant cells by transient viral vectors. *Trends in Biotechnology* 29: 363 – 369.

Vanblaere, T., Szankowski, I., Schaart, J., Schouten, H., Flachowsky, H., Brogгинi, G.A.L. & Gessler, C. (2011). The development of a cisgenic apple plant. *Journal of Biotechnology* 154: 304 – 311.

Veilleux, R.E. & Johnson, A.A.T. (1998). Somaclonal variation: Molecular analysis, transformation interaction and utilization. *Plant Breeding Reviews* 16: 229 – 268.

Verhoeven, K.J.F., Jansen, J.J., van Dijk, P.J. & Biere, A. (2010). Stress-induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions. *New Phytologist* 185: 1108 – 1118.

Vigne, E., Komar, V. & Fuchs, M. (2004). Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of grapevine fanleaf virus. *Transgenic Research* 13: 165 – 179.

Viswanath, V. & Strauss, S.H. (2010). Modifying plant growth the cisgenic way. *ISB News Report*, September 2010. [www.isb.vt.edu/news/2010/Sep/Modifying-Plant-Growth-Cisgenic-Way.pdf](http://www.isb.vt.edu/news/2010/Sep/Modifying-Plant-Growth-Cisgenic-Way.pdf) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

Vleeshouwers, V., Rietman, H., Krenek, P., Champouret, N., Young, C., Oh, S.K., Wang, M.Q., Bouwmeester, K., Vosman, B., Visser, R.G.F., Jacobsen, E., Govers, F., Kamoun, S. & Van der Vossen, E.A.G. (2008). Effector



genomics accelerates discovery and functional profiling of Potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. *Plos One* 3: e2875.

## **W**

Wackernagel, W. (2012). Neue genetische Techniken für die Pflanzenzucht. [http://www.nfp59.ch/d\\_resultate.cfm?kat=19](http://www.nfp59.ch/d_resultate.cfm?kat=19) (zuletzt besucht am 19. September 2012).

Waltz E. (2011a). GM grass eludes outmoded USDA oversight. *Nature Biotechnology* 29: 772 – 773.

Waltz, E. (2011b). Cisgenic crop exemption. *Nature Biotechnology* 29: 677.

Waltz, E. (2012). Tiptoeing around transgenics. *Nature Biotechnology* 30: 215 – 217.

Wang, Q.C. & Valkonen, J.P.T. (2008). Elimination of two viruses which interact synergistically from sweet-potato by shoot tip culture and cryotherapy. *Journal of Virological Methods* 154: 135 – 145.

Wang, Q.C. & Valkonen, J.P.T. (2009). Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends in Plant Science* 14: 119 – 122.

Wang, M.B. & Waterhouse, P.M. (2001). Application of gene silencing in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 146 – 150.

Wang, W., Zheng, H., Fan, C., Li, J., Shi, J., Cai, Z., Zhang, G., Liu, D., Zhang, J., Vang, S., Lu, Z., Wong, G.K.-S., Long, M. & Wang, J. (2006a). High rate of chimeric gene origination by retroposition in plant genomes. *Plant Cell* 18: 1791 – 1802.

Wang, Z., Ni, Z., Wu, H., Nie, X. & Sun, Q. (2006b). Heterosis in root development and differential gene expression between hybrids and their parental inbreds in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1283 – 1294.

Wang, Q., Cuellar, W.J., Rajamäki, M.-L., Hirata, Y. & Valkonen, J.P.T. (2008). Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Molecular Plant Pathology* 9: 237 – 250.

Wassenegger, M., Krczal, G. & Dalakouras, A. (2010). Method for the production of a transgene-free plant with altered methylation pattern. European Patent Application EP 2 198 700 A1. European Patent Office.

Weber, E., Gruetzner, R., Werner, S., Engler, C. & Marillonnet, S. (2011). Assembly of Designer TAL Effectors by Golden Gate Cloning. *PLoS ONE* 6: e19722.

Weigel, D. & Nilsson, O. (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 377: 495 – 500.

Weinthal, D., Tovkach, A., Zeevi, V. & Tzfira, T. (2010). Genome editing in plant cells by zinc finger nucleases. *Trends in Plant Science* 15: 308 – 321.

Wijnker, E. & de Jong, H. (2008). Managing meiotic recombination in plant breeding. *Trends in Plant Science* 13: 640 – 646.

Wijnker, E., van Dun, K., de Snoo, C.B., Lelivelt, C.L., Keurentjes, J.J., Naharudin, N.S., Ravi, M., Chan, S.W., de Jong, H. & Dirks, R. (2012). Reverse breeding in *Arabidopsis* generates homozygous parental lines from a heterozygous plant. *Nature Genetics* 44 : 467 – 470.

Wright, D.A., Townsend, J.A., Winfrey, R.J., Jr., Irwin, P.A., Rajagopal, J., Lonosky, P.M., Hall, B.D., Jondle, M.D. & Voytas, D.F. (2005). High-frequency homologous recombination in plants mediated by zincfinger nucleases. *Plant Journal* 44: 693 – 705.

Wu, H., Sparks, C.A., & Jones, H.D. (2006). Characterization of T-DNA loci and vector backbone sequences in transgenic wheat produced by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding* 18: 195 – 208.

Wu, R., Guo, W. L., Wang, X. R., Wang, X. L., Zhuang, T. T., Clarke, J. L. & Liu, B. (2009). Unintended consequence of plant transformation: biolistic transformation caused transpositional activation of an endogenous retrotransposon Tos17 in rice ssp. japonica cv. Matsumae. *Plant Cell Reports* 28: 1043 – 1051.

## **X**

Xu, G.L. & Bestor, T.H. (1997) Cytosine methylation targetted to pre-determined sequences. *Nature Genetics* 17: 376 – 378.

Xu, J., Wang, Y.Z., Yin, H.X. & Liu, X.J. (2009). Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Malus zumi* (Matsumura) Rehd using leaf explant regeneration system. *Electronic Journal of Biotechnology* 12(1).

## **Y**

Yamagishi, N. & Yoshikawa, N. (2011a). Virus-induced gene silencing of endogenous genes and promotion of flowering in soybean by Apple latent spherical virus-based vectors. In: Sudaric, A. (ed.), *Soybean – Molecular Aspects of Breeding*, InTech Publishers, pp. 43 – 56.

Yamagishi, N. & Yoshikawa, N. (2011b). Expression of FLOWERING LOCUS from *Arabidopsis thaliana* induces precocious flowering in soybean irrespective of maturity group and stem growth habit. *Planta* 233: 561 – 568.

Yamagishi, N., Sasaki, S., Yamagata, K., Komori, S., Nagase, M., Wada, M., Yamamoto, T. & Yoshikawa, N. (2011). Promotion of flowering and reduction of a generation time in apple seedlings by ectopical expression of the *Arabidopsis thaliana* FT gene by using the Apple latent spherical virus vector. *Plant Molecular Biology* 75: 193 – 204.

Yi, H.B., Park, J.E., Kwon, M.C., Park, S.K., Kim, C.G., Jeong, S.C., Yoon, W.K., Park, S.M., Han, S.L., Harn, C.H. & Kim, H.M. (2006). Environmental risk assessment of watermelon grafted onto transgenic rootstock resistant to cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) on non-target insects in conventional agroecosystem. *Journal of Ecology and Field Biology* 29: 323 – 330.

Youk, E.S., Pack, I.S., Kim, Y.J., Yoon, W.K., Kim, C.G., Ryu, S.B., Harn, C.H., Jeong, S.C. & Kim, H.M. (2009). A framework for molecular genetic assessment of a transgenic watermelon rootstock line. *Plant Science* 176: 805 – 811.

## **Z**

Zabala, G. & Vodkin, L. (2007). Novel exon combinations generated by alternative splicing of gene fragments mobilized by a CACTA transposon in *Glycine max*. *BMC Plant Biology* 7: 38.

Zeevi, V., Tovkach, A. & Tzfira, T. (2008). Increasing cloning possibilities using artificial zinc finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105: 12785 – 12790.

Zenna, N.S., Cruz, F.C.S., Javier, E.L., Duka, I.A., Barrion, A.A. & Azzam, O. (2006). Genetic analysis of tolerance to rice tungro bacilliform virus in rice (*Oryza sativa* L.) through agroinoculation. *Journal of Phytopathology* 154: 197 – 203.

Zhang, J., Cai, L., Cheng, J., Mao, H., Fan, X., Meng, Z., Chan, K.M., Zhang, H., Qi, J., Ji, L. & Hong, Y. (2008). Transgene integration and organization in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genome. *Transgenic Research* 17: 293 – 306.

Zhang, H., Harry, D.E., Ma, C., Yuceer, C., Hsu, C.-Y. Vikram, V., Shevchenko, O., Etherington, E. & Strauss, S.H. (2010a). Precocious flowering in trees: the FLOWERING LOCUS T gene as a research and breeding tool in *Populus*. *Journal of Experimental Botany* 61: 2549 – 2560.

Zhang, F., Maeder, M.L., Unger-Wallace, E., Hoshaw, J.P., Reyon, D., Christian, M., Li, X., Pierick, C.J., Dobbs, D., Peterson, T., Joung, J.K. & Voytas, D.F. (2010b). High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 12028 – 12033.

- Zhao, Z., Zhu, Y., Erhardt, M., Ruan, Y. & Shen, W.H. (2009). A non-canonical transferred DNA insertion at the BRI1 locus in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology* 51: 367 – 373.
- Zhou, Y., Duan, H., Zhou, C., Li, J., Gu, F., Wang, F., Zhang, Z. & Gao, Z. (2009). Hairy root induction and plant regeneration of *Rehmannia glutinosa* Libosch. f. *hueichingensis* Hsiao via *Agrobacterium rhizogenes* - mediated transformation. *Russian Journal of Plant Physiology* 56: 224 – 231.
- Zhu, T., Peterson, D.J., Tagliani, L., St Clair, G., Baszczynski, C.L. & Bowen, B. (1999). Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 8768 – 8773.
- Zhu, T., Mettenburg, K., Peterson, D.J., Tagliani, L. & Baszczynski, C.L. (2000). Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nature Biotechnology* 18: 555 – 558.
- Zhu, L., Holfors, A., Ahlman, A., Xue, Z. & Welander, M. (2001). Transformation of the apple rootstock M.9/29 with the rolB gene and its influence on rooting and growth. *Plant Science* 160: 433 – 439.
- Zhu, L.H., Li, X.Y. & Welander, M. (2009). Can *Arabidopsis* AP1 gene shorten the juvenility of apple? *Acta Horticulturae* 829: 259 – 264.
- Zhuang, Y. & Adams, K.L. (2007). Extensive allelic variation in gene expression in *Populus* F1 hybrids. *Genetics* 177: 1987 – 1996.
- ZKBS (2012). Stellungnahme zu neuen Techniken für die Pflanzenzüchtung. Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS). [www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06\\_Gentechnik/ZKBS/01\\_Allgemeine\\_Stellungnahmen\\_deutsch/04\\_Pflanzen/Neue\\_Techniken\\_Pflanzenzuechtung.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=3](http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/ZKBS/01_Allgemeine_Stellungnahmen_deutsch/04_Pflanzen/Neue_Techniken_Pflanzenzuechtung.pdf?__blob=publicationFile&v=3) (zuletzt besucht am 19. September 2012).
- Zucchi, M.I., Arizona, H., Morais, V.A., Fungaro, M.H.P. & Vieira, M.L.C. (2002). Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. *Genetics and Molecular Biology* 25: 91 – 96.