

BioFokus

Chancen & Herausforderungen für die Genom-Editierung in der Pflanzenzucht

Prof. Dr. Sebastian Soyk

Département de biologie moléculaire végétale, Université de Lausanne

Chances et défis de l'édition génomique pour la culture des végétaux

Prof. Dr. Sebastian Soyk

Département de biologie moléculaire végétale, Université de Lausanne

Forschung für Leben


www.forschung-leben.ch

Zusammenfassung

Résumé

Worum es geht

Neuste Entwicklungen in der Gentechnologie ermöglichen die gezielte und präzise Veränderung von Genen in Menschen, Tieren und Pflanzen mittels Genom-Editierung. In der Humanmedizin werden schon die ersten Therapien für genetische Krankheiten zugelassen¹ – Eingriffe ins Genom von Nutzpflanzen, um deren Eigenschaften rasch und vorhersehbar zu verändern, werden allerdings oft kritisch gesehen. Das steht im Konflikt mit einem breiten wissenschaftlichen Konsens^{2,3}, dass «naturidentische» Produkte der Genom-Editierung denen aus etablierten Züchtungsverfahren gleichzusetzen sind. Dieser Artikel versucht bestehende Missverständnisse aufzuklären, indem er die molekularen Grundlagen der Domestizierung und Züchtung aufzeigt und veranschaulicht, wie Genom-Editierung als logische Erweiterung an bisher akzeptierten Verfahren in der Pflanzenzucht anknüpft.

De quoi s'agit-il?

Les progrès récents du génie génétique permettent une modification ciblée et précise de gènes de l'être humain, de l'animal ou de la plante au moyen de l'édition génomique (modification localisée du génome). Les premiers traitements visant des maladies génétiques sont déjà autorisés en médecine humaine¹. En revanche, les interventions dans le génome des plantes cultivées pour modifier leurs caractéristiques rapidement et de manière prévisible sont souvent controversées. Ceci est en contradiction avec le large consensus scientifique^{2,3} que des produits «naturels identiques» issus de l'édition génomique sont équivalents à ceux issus des processus de culture classiques. Cet article s'efforce d'éliminer les malentendus existants en exposant les bases moléculaires de la domestication et de la culture et en montrant comment l'édition génomique s'intègre à la culture des végétaux en complétant logiquement les processus déjà acceptés.

Chancen & Herausforderungen für die Genom-Editierung in der Pflanzenzucht

Inhaltsverzeichnis

- **Was sind Mutationen und wieso sind sie wichtig für die Züchtung?** 3
- **Was versteht man unter Genom-Editierung?** 4
- **Was kann die Genom-Editierung schon heute in Nutzpflanzen leisten?** 5
- **Wo werden derzeit die Grenzen der Genom-Editierung weiter verschoben?** 7
- **Was sind derzeitige Herausforderungen für die Genom-Editierung in Nutzpflanzen?** 8
- **Welchen Mehrwert bietet die Genom-Editierung für die Pflanzenzucht?** 10
- **Ausblick** 10
- **Referenzen** 11

Was sind Mutationen und wieso sind sie wichtig für die Züchtung?

Ob weisse oder violette Blüten, lange oder kurze Sprosse – die Ausprägung und Vererbung von Merkmalen wird weitestgehend von Genen bestimmt, das wurde rückblickend schon in Gregor Mendels Studien während des 19. Jahrhunderts klar⁴. Die Anzahl der Gene in verschiedenen Sorten einer Kulturpflanzenart sind allerdings weitestgehend identisch. Genome von Weizen enthalten ~100 000 Gene, das Genom verschiedener Tomaten ~30 000 und im Vergleich unser menschliches Genom ~20 000 Gene⁵⁻⁷. Doch warum gibt es dann rote, gelbe oder grüne Tomaten, die rund, länglich, klein oder gross sein können? Diese Unterschiede basieren hauptsächlich auf Mutationen in Genen, also auf Abweichungen in der Sequenz der Basenpaaren von DNA. Mutationen führen häufig zur Deaktivierung eines

Genes, allerdings können sie aber auch genau das Gegenteil bewirken und die Aktivität eines Gens erhöhen. Mutationen entstehen, wenn die DNA beschädigt und fehlerhaft repariert wird. Schäden können durch UV-Strahlung der Sonne oder durch Kopierfehler während der Zellteilung verursacht werden. Bei der Reparatur können aus Versehen einzelne Basenpaare eingefügt, entfernt oder ausgetauscht werden. Solch kleine Punktmutationen können die Aminosäuresequenz der kodierten Proteine und so deren Aktivität verändern, was einen Einfluss auf das Wachstum oder den Stoffwechsel der Pflanze haben kann. Neben Punktmutationen kann es auch zu grösseren, strukturellen Mutationen kommen, in denen DNA Abschnitte von Duzenden oder sogar Tausenden Basenpaaren verloren gehen, dupliziert oder eingefügt werden. Die Häufigkeit von natürlich auftretenden Mutationen wurde in Laborexperimenten empirisch bestimmt⁸ und darauf basierende Hochrechnungen legen nahe, dass in jedem Hektar Weizenfeld mehrere Milliarden Mutationen spontan entstehen und deshalb kaum ein geerntetes Korn dem anderem gleicht. Auch wenn die wenigsten der Mutationen das Wachstum und den Stoffwechsel der Pflanze beeinflussen, zeigt es doch wie allgegenwärtig Mutationen in Nutzpflanzen sind und dass die Definition einer Sorte relativ ist, da sich Genome im Fluss befinden, sich also kontinuierlich durch neue Mutationen verändern und sich verschiedene Individuen einer Sorte genetisch unterscheiden können.

Menschen nutzen Genmutationen schon seit Jahrtausenden um Pflanzen zu domestizieren und zu züchten, auch wenn uns dies erst seit vergleichsweise kurzer Zeit bewusst ist. Die Domestizierung von Pflanzen begann vor ca. 10 000 Jahren als der Mensch zu einem sesshaften Lebensstil überging. Durch menschliche Selektion entstanden aus Wildpflanzen domestizierte Arten mit Merkmalen, die menschliche Bedürfnisse besser befriedigten aber in der Natur oft zum Nachteil wurden. Bei Gräsern, aus denen heutige Getreide hervorgingen, selektierte der Mensch für Sorten

mit weichen Spelzen und festen Ähren, die ihre Samen nicht mehr abwerfen. Bei Tomaten wurden grössere Früchte (**Abbildung 1**), bei Mandelbäumen ein verringerter Blausäuregehalt selektiert. So transformierte der Mensch Wildpflanzen zu Kulturpflanzen, in Mittelamerika das Wildgras Teosinte zu Mais, in den Anden Südamerikas knollenbildende, krautige Wildpflanzen zu Kartoffel, und im Nahen Osten heimische Wildgräser zu Weizen. Diese Selektion fand ohne das Wissen über Gene und Mutationen statt, die sich bis auf wenige frei vermischten und in Folgegenerationen stetig neu kombinieren konnten. So unterscheiden sich Nutzpflanzen von ihren wilden Vorfahren durch Tausende von Mutationen und nur für wenige kennt man die Merkmale, die sie beeinflussen^{9,10}. Durch gezielte Kreuzung begann der Mensch dann die Gene und Mutationen verschiedener Sorten zu kombinieren, um neue Sorten mit den besten Genkombinationen und Merkmalen zu schaffen. Um die genetische Diversität in Nutzpflanzen noch weiter zu erhöhen, wurden ab der Mitte des 20. Jahrhundert zusätzlich Mutationen durch Chemikalien oder radioaktive Strahlung künstlich induziert. Durch diese Mutagenesezüchtung wurden bis heute mehr als 3 000 Nutzpflanzensorten erzeugt¹¹, wie z. B. viele der Hartweizensorten für die Herstellung von Teigwaren. Allerdings entstehen Mutationen während der Mutagenesezüchtung nach dem Zufallsprinzip, sodass die gewünschten Genvarianten in Folgegenerationen aufwendig ausselektiert und durch langfristige Rückkreuzungsprogramme von ungewünschten Mutationen getrennt werden müssen.

In den letzten Jahrzehnten wurden mit den technischen Fortschritten in der Genomforschung viele der Mutationen, die der Mensch zur Domestizierung und Züchtung von Nutzpflanzen nutzte, auch auf molekularer Ebene aufgedeckt. Diese Erkenntnisse werden schon heute genutzt um die besten Genkombinationen mit molekularen Methoden wie «Marker Assisted Selection» und «Genomic Selection» zuverlässig und kostengünstig zu selektieren. Durch die Genom-Editierung können diese

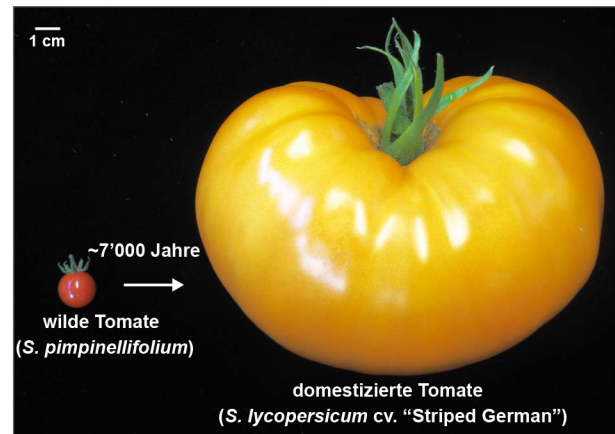


Abbildung 1: Durch menschliche Selektion wurden die Früchte der Tomate während der Domestizierung stark vergrößert.

Gene nun auch gezielt und präzise verändert werden, um das Zufallsprinzip in der Pflanzenzüchtung noch weiter zu verringern. So stellt eine Integration der Genom-Editierung in bestehende Züchtungsverfahren den logischen nächsten Schritt dar, um das Werkzeugsortiment des zukunftsorientierten Züchters zu erweitern.

Was versteht man unter Genom-Editierung?

Die Genom-Editierung ermöglicht das gezielte Einführen von Mutationen in Genome mithilfe von sequenzspezifischen Nuklease Enzymen, welche DNA mit einer vorgegebenen Sequenz schneiden können. Das derzeit verbreitetste Verfahren ist CRISPR-Cas, welches auf den Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-associated (Cas) Nukleasen basiert. Das CRISPR-Cas System (**Abbildung 2**) besteht aus zwei Komponenten: einer Cas Nuklease, die DNA schneidet, und einem guide RNA (gRNA) Nukleinsäuremolekül, welches die Zielsequenz im Genom bestimmt. Dazu bilden Cas Nuklease und gRNA einen molekularen Komplex, der das Genom für die komplementäre Sequenz der gRNA absucht. Am Ziel angekommen hybridisiert die Sequenz der gRNA mit der Zielsequenz im Genom

und erlaubt der Cas Nuklease die DNA zu schneiden und somit einen Doppelstrangbruch einzufügen. Die Zelle erkennt den Schaden und versucht ihn zu beheben. Allerdings unterlaufen der Zelle dabei, wie bei natürlich induzierten DNA Beschädigungen, häufig Fehler und es können einzelne oder mehrere Basen entfernt oder hinzugefügt werden und Mutationen entstehen. Somit können durch Genom-Editierung gezielt Mutationen in gewünschte Gene eingefügt werden, die auf molekularer Ebene mit natürlich auftretenden Mutationen identisch sind.

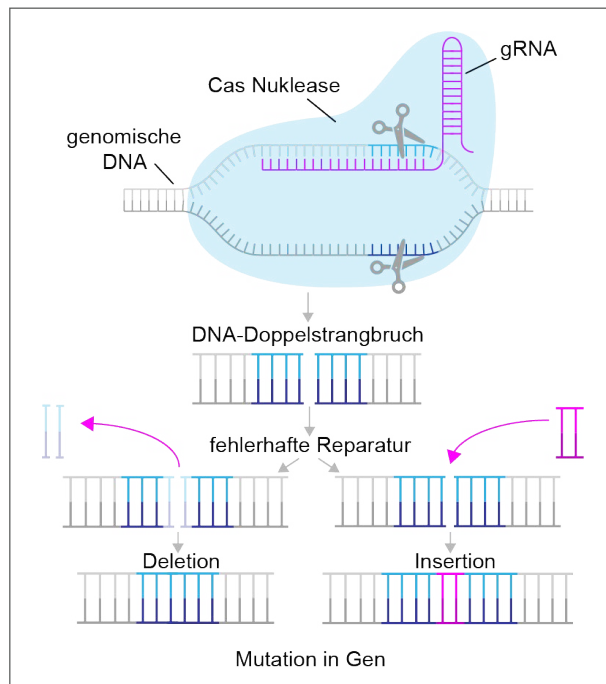


Abbildung 2: Mit CRISPR-Cas kann DNA präzise geschnitten werden und gezielt Mutationen in Gene eingebracht werden.

Was kann die Genom-Editierung schon heute in Nutzpflanzen leisten?

Der Katalog an Anwendungen in der Genom-Editierung ist enorm vielseitig und wird ständig mit neuen Methoden erweitert. Welche davon in der Pflanzenzucht eingesetzt werden sollen wird derzeit in Gesellschaft, Politik und Wissenschaft gemeinsam diskutiert. Genetische Veränderungen,

die den klassischen Mutationen aus der traditionellen Züchtung gleichen, geniessen bisher die grösste Akzeptanz. Überschreitungen von Artgrenzen werden oftmals abgelehnt, auch wenn solch horizontaler Gentransfer auch in konventionellen Züchtungen «natürlich» vorkommt. So beruht eine Resistenz gegen den pathogenen *Fusarium* Pilz in Weizen auf dem *Fhb7* Gen, das durch Kreuzung mit einem verwandten Wildgrass eingezüchtet wurde. Allerdings wurde das *Fhb7* Gen ursprünglich von dem symbiontischen *Epichloë* Pilz durch «natürlichen» horizontalen Gentransfer auf das Wildgrass übertragen¹². Fälle von horizontalem Gentransfer sind auch für andere Nutzpflanzen bekannt. So wurden etwa bakterielle Gene in Süskartoffeln und artfremde Pflanzengene in Hirse nachgewiesen¹². Neben Artgrenzen werden auch Obergrenzen für die Anzahl und Grösse der Mutationen diskutiert, die durch Genom-Editierung eingebracht werden sollten. Hier stellt sich der Vergleich zu traditionellen Züchtungen noch schwieriger dar. So werden bei einer gängigen Züchtungspraxis, der Introgression, Nutzpflanzen mit wilden Verwandten gekreuzt¹³. Dabei werden Genome verschiedener Arten kombiniert, die sich oft durch Millionen von Mutationen unterscheiden¹⁴ und viele dieser Mutationen erstrecken sich über Tausende Basenpaare¹⁵. Um in dieser polarisierten Lage einen Konsens zu finden, stellt dieser Artikel primär Anwendungen vor, die zu Veränderungen in arteigener DNA führen ohne direkt artfremde DNA Sequenzen einzufügen. Solche genom-editierte Pflanzen sind auf molekularer Ebene identisch zu traditionellen Züchtungen.

Die einfachste Anwendung von CRISPR-Cas ist das Ausschalten von Genen. Hierzu wird ein gRNA Molekül mit einer Zielgen-spezifischen Sequenz entworfen und zusammen mit dem Nuklease Enzym in die Pflanzenzelle eingebracht. Der gRNA-Nuklease Komplex sucht das gewünschte Gen im Genom und induziert dort einen DNA Doppelstrangbruch, der von der Zelle als Schaden erkannt und repariert wird. Falls bei der Reparatur Fehler auftreten, wird das Gen deaktiviert. In vielen Nutzpflanzen ist das Ausschalten von Genen mit

CRISPR-Cas schon Standard¹⁶. So wurde durch die Deaktivierung eines Gens die Resistenz von Apfel gegenüber Feuerbrand verbessert¹⁷. Auch konnte in Tomate und Kartoffel durch Ausschalten einzelner Gene die Resistenz gegenüber Kraut- und Braunfäule beziehungsweise Kraut- und Knollenfäule verbessert werden^{18,19}. Darüber hinaus konnten durch Mutation eines Gens Tomaten generiert werden, die schneller blühen und früher reife Früchte tragen²⁰. Da ähnliche, «homologe» Gene oftmals gleiche, «konservierte» Funktionen in unterschiedlichen Arten ausüben, können Mutation von homologen Genen in verschiedenen Arten zu vergleichbaren Merkmalsveränderungen führen. Zum Beispiel wurden genom-editierte Mutationen in homologe Gene von Tomate, Kiwi und *Physalis* eingeführt, um kompakten Wuchs und frühen Ertrag zu erreichen^{20–22}.

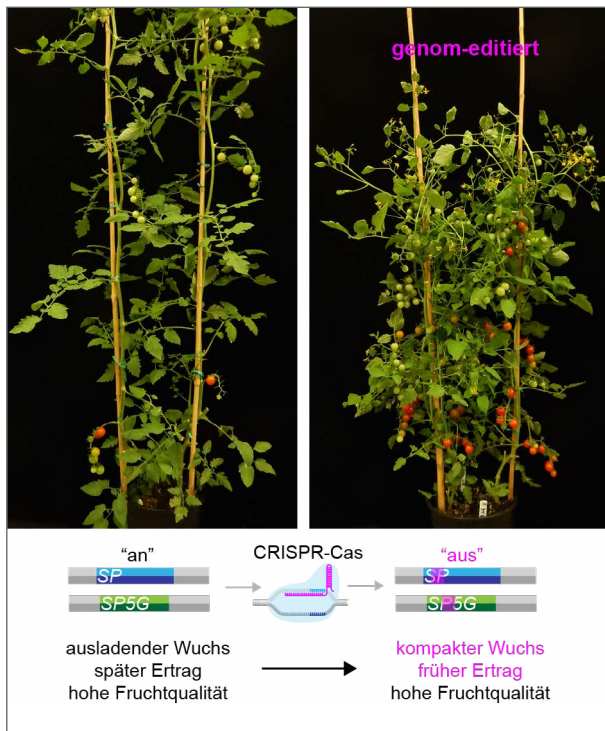


Abbildung 3: Mit CRISPR-Cas können Gene und Merkmale rasch und gezielt verändert werden.

Durch sogenanntes «gRNA-Multiplexing» können durch die Verwendung multipler gRNA Sequenzen mehrere Gene gleichzeitig mutiert werden, um sowohl verschiedene Merkmale gleichzeitig als auch einzelne Merkmale, die von mehreren Genen kontrolliert werden, zu verändern. So wurden in Tomaten mehrere Gene gleichzeitig ausgeschaltet, um die Wuchsform und Fruchtreife besser an räumliche Anbaubedingungen der urbanen Landwirtschaft²³ (**Abbildung 3**) oder die Farbe der Früchte an Verbraucherwünsche anzupassen²⁴. In Weizen wurden mit dieser Strategie Anfälligkeitsgene aus der *Mildew resistance locus o* (*Mlo*) Genfamilie deaktiviert, um die Resistenz gegen Mehltau zu verbessern^{25,26}. Es ist erwähnenswert, dass spontane Mutationen in *Mlo* Genen schon seit den 1930er Jahren in Gerste bekannt sind und bis heute bei der Züchtung von resistenten Gerstensorten verwendet werden²⁷. Allerdings kodiert das Weizen-genom für drei redundante *Mlo* Gene und nur das gleichzeitige Ausschalten aller drei Gene führt zur Resistenz, was durch Genom-Editierung erreicht wurde, aufgrund der Komplexität des Weizen-genoms durch konventionelle Züchtung allerdings praktisch unmöglich ist.

Jedoch wird die Präzision der Genom-Editierung immer wieder angezweifelt, da CRISPR-Cas zu sogenannten «off-target» Mutationen führen kann, falls die Nuklease nicht nur am gewünschten Ziellort, sondern auch an anderen Stellen im Genom schneidet. Systematische Studien in Reis, Tomate und der Modelnpflanze *Physcomitrium* konnten nun durch Genomanalyse von editierten Pflanzen und Kontrollpflanzen aufzeigen, dass bei korrektem gRNA-Design kaum «off-target» Mutationen zu erwarten sind^{28–30}. Besonders im Vergleich zu der grossen Anzahl an unbekanntem Mutationen, die in der Kreuzungs- und Mutagenesezüchtung weitestgehend nach dem Zufallsprinzip neu kombiniert werden, sind ungewollte «off-target» Mutationen von CRISPR-Cas vernachlässigbar klein.

Wo werden derzeit die Grenzen der Genom-Editierung weiter verschoben?

Das Ausschalten von einzelnen und mehreren Genen mit CRISPR-Cas ist in vielen Nutzpflanzen mittlerweile Routine, allerdings kann so nicht immer der gewünschte Effekt erzielt werden. Viele Mutationen, die während der Domestizierung und Züchtung selektiert wurden, führen nicht zum vollen Verlust, sondern eher zu einer teilweisen Herauf- oder Herunterregulierung der Genaktivität. So wurde während der Domestizierung von Tomate eine enorme, 294-Tausend Basenpaar grosse Mutation selektiert, welche die regulatorische Sequenz des *FAS* Gens unterbricht und zu einer teilweisen Herunterregulierung des Gens und Pflanzen mit grösseren Früchten führt³¹. Wenn dagegen das Gen mit CRISPR-Cas durch eine präzise Mutation in der kodierenden Sequenz komplett ausgeschaltet wird, tragen die Pflanzen noch grössere Früchte, allerdings mit vermindertem Ertrag³². Davon inspiriert wurde ein CRISPR-Cas Verfahren entwickelt, um Mutationen zur Feinregulation von Ge-

nen zu generieren, ähnlich einem Dimmer zur Regulation der Lichtstärke. So wurden gezielt Mutationen in die regulatorischen Sequenzen des *FAS* Gens eingeführt, um eine nahezu stufenlose Deaktivierung des Gens zu erreichen und verschiedene Fruchtgrössen zu erzeugen ohne Erträge negativ zu beeinflussen³³. Das gleiche Verfahren konnte auch zur graduellen Erhöhung der Kornanzahl in Mais und der Standfestigkeit in Reis angewendet werden^{34,35}. Durch Genom-Editierung von regulatorischen Sequenzen können also verschiedene Merkmale feinjustiert und aufeinander abgestimmt werden, um negative Wechselwirkungen zu minimieren.

Besonders interessant für die Pflanzenzucht sind ausserdem die Werkzeuge der Präzision Genom-Editierung, die das gezielte Umschreiben von Gensequenzen ermöglichen. Mit CRISPR-basierten Methoden wie Basen-Editierung, Prime-Editierung und Gene-Targeting können schon hoch-präzise genetischen Eingriffe erreicht werden (**Abbildung 4**).

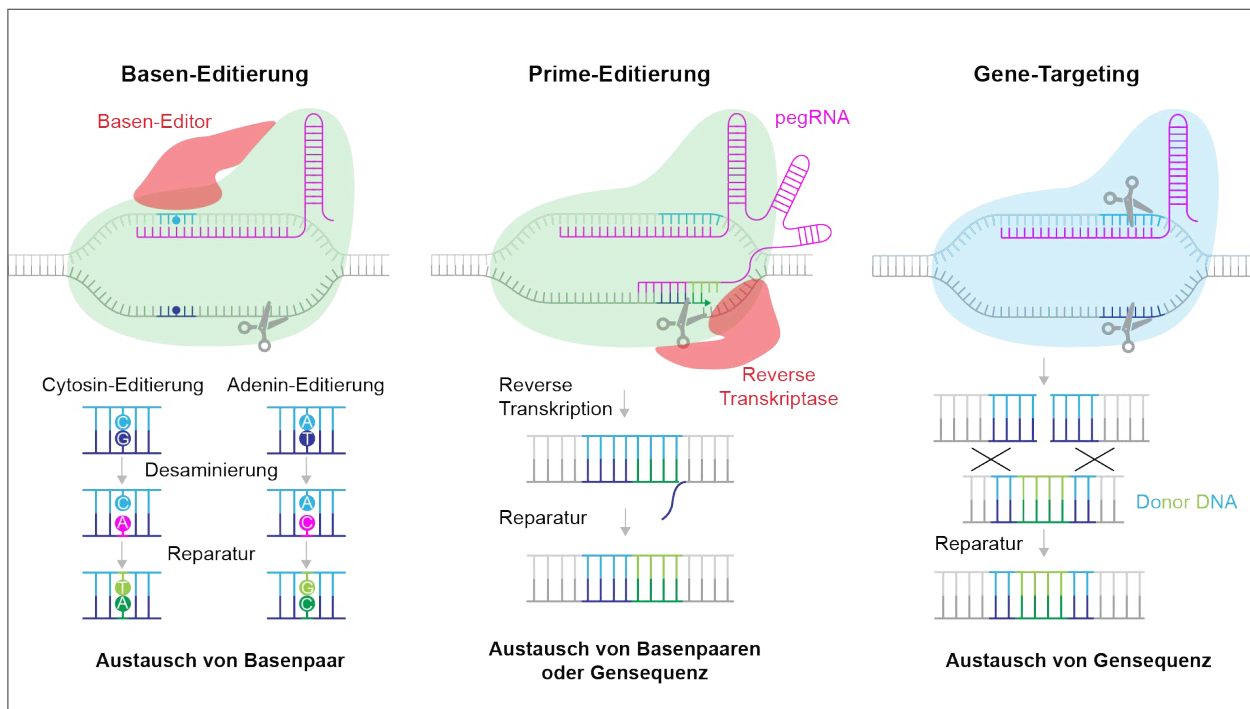


Abbildung 4: Durch neue Präzisionsverfahren der Genom-Editieren können einzelne Basenpaaren bis ganze Gene umgeschrieben und ausgetauscht werden.

Bei der Basen-Editierung wird eine modifizierte Cas Nuklease mit Desaminase Enzymen fusioniert, die DNA Basen desaminieren und somit verändern können. Die Cytosin Basen-Editoren³⁶ induzieren C•G zu T•A Transitionen indem sie Cytosine (C) desaminieren, was zu einem Austausch des Guanins (G) zu Adenin (A) auf dem komplementären Strang führt. Adenin Basen-Editoren³⁷ induzieren die entgegengesetzten A•T zu G•C Transitionen durch Desaminierung von Adenin (A). Mit Basen-Editierung können so einzelne Basenpaare im Genom gezielt ausgetauscht werden und die Sequenz von Genen präzise umgeschrieben werden. In Reis wurde durch Basen-Editierung ein einzelnes Basenpaar des *IPA* Gens präzise umgeschrieben, um dessen Aktivität zu erhöhen und die Standfestigkeit der Pflanzen zu verbessern³⁸. Mit Basen-Editierung können auch ungewollte Mutationen korrigiert werden, die während der Züchtung und Domestizierung angereichert wurden³⁹. Da der Grossteil von spontanen Punktmutationen G•C zu A•T Transitionen sind⁸, könnten diese mit den vorhandenen Werkzeugen repariert oder übertragen werden.

Basen-Editoren können zwar einzelne Basenpaare austauschen aber ermöglichen keine komplexeren Veränderungen von Genen. Grössere Flexibilität bieten die Prime-Editoren⁴⁰, die aus einer modifizierten Nuklease und einem reversen Transkriptase Enzym bestehen, welches RNA in DNA umschreiben kann. Eine spezielle gRNA, die prime-editing gRNA (pegRNA), führt den Prime-Editor zum Zielort im Genom und beinhaltet zudem die Sequenz, die dort eingefügt werden soll. Der Prime-Editor schreibt diesen Teil der pegRNA zu einem DNA-Molekül um, das von der Zelle während der Reparatur eingebaut wird. Prime-Editing wurde unter Laborbedingungen schon in Reis, Weizen und anderen Pflanzen angewendet^{41–43}, allerdings muss besonders die Effizienz weiter optimiert werden, um eine breite Anwendung in der Pflanzenzüchtung zu ermöglichen.

Eine weitere Methode der Präzisions-Editierung ist Gene-Targeting, mit der gezielt grössere DNA

Sequenzen ausgetauscht oder neu eingebracht werden können⁴⁴. Die Methode nutzt zelleigenen Reparaturmechanismen, die zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen homologe DNA-Sequenzen als Korrekturvorlage benutzt. Beim Gene-Targeting werden deshalb zusätzlich zu der Nuklease und gRNA auch ein «Donor» DNA-Molekül mit der gewünschten Sequenz in die Zelle eingeführt. Während der Reparatur des Doppelstrangbruchs wird dann die Sequenz des Donor DNA-Moleküls ins Genom übertragen. So können ganze Gene präzise ausgetauscht oder neu eingefügt werden. Dies ist besonders für die Züchtung von Krankheitsresistenzen interessant, da hier oft das Anschalten oder Einbringen von Resistenzgenen (R-Gene) erstrebenswert ist, die einem Befall entgegenwirken. Kombinationen von mehreren R-Genen (R-Gen Stacking) werden sehr erfolgreich mit transgener Technologie in der Kartoffel angewendet, um transgene Sorten mit anhaltender Resistenz gegen Kraut- und Knollenfäule zu erzeugen⁴⁵. Ähnlich könnten durch Gene-Targeting R-Gene von resistenten, nahverwandten Wildpflanzen auf krankheitsanfällige Sorten eingebracht werden, um Sorten zu erzeugen, die sonst aufwendige Rückkreuzungen erfordern. Bisher sind das Einbringen und Austauschen von Genen durch Gene-Targeting in Pflanzen jedoch noch sehr ineffizient, allerdings wird die Technologie aktiv weiterentwickelt und optimiert⁴⁶.

Was sind derzeitige Herausforderungen für die Genom-Editierung in Nutzpflanzen?

Eine grosse Hürde für eine breitere Anwendung von Genom-Editierung in der Pflanzenzüchtung ist, dass die Effizienz stark zwischen verschiedenen Nutzpflanzen schwanken kann. Dies liegt nicht an den Nuklease Enzymen oder gRNA-Molekülen an sich, sondern vielmehr an den Verfahren um sie in Pflanzenzellen einzubringen und Pflanzen aus genom-editierten Zellen zu regenerieren. In vielen Arten werden Nukleasen und gRNA als DNA-Sequenz in die Zelle eingebracht, stabil in das Genom

integriert und in der Folgegeneration genetisch aussegregiert. Allerdings kann diese Strategie nicht in allen Nutzpflanzen angewandt werden, da in Arten mit hybriden und hoch heterozygoten Genomen wie Kartoffel oder Weinrebe in Folgegenerationen auch gewünschte Eigenschaften segregieren und verloren gehen können. Daher wurden DNA-freie Methoden entwickelt, bei denen die gRNA und Nuklease als Ribonukleoproteinkomplex (RNP) direkt in die Pflanzenzelle eingebracht werden⁴⁷. Allerdings ist diese Methode technisch noch sehr anspruchsvoll und oft ineffizient. Neben dem Einbringen der CRISPR Werkzeuge ist besonders die Regenerierung von Pflanzen aus einzelnen Zellen limitierend, da dieser Prozess stark zwischen verschiedenen Arten variiert. Durch die Verwendung pflanzeigener Regenerationsregulatoren konnten allerdings bereits signifikante Fortschritte in schwer zu regenerierbaren Arten wie Mais, Weizen und Zitruspflanzen erzielt werden⁴⁸. Darüber hinaus werden Verfahren entwickelt, die ganz ohne Regenerierung von Einzelzellen auskommen sollen^{49,50}. Allerdings muss noch gezeigt werden, wie gut diese Verfahren in verschiedenen Nutzpflanzen anwendbar sind.

Das Ausschalten von Genen ist mittlerweile in vielen Nutzpflanzen Routine und hocheffizient. Allerdings leiden Präzisionsverfahren wie Basen-Editierung, Prime-Editing und Gene-Targeting noch unter oftmals sehr niedrig Erfolgsquoten, was einer breiten Anwendung in der Pflanzenzucht im Wege steht. Da jedoch auch ein grosses Interesse an der Präzisions-Editierung im biomedizinischen Bereich besteht, werden die Nuklease Enzyme und gRNA-Moleküle stetig weiterentwickelt und für neue Anwendungen optimiert. So konnte zum Beispiel die Effizienz der Adenin Basen-Editoren in menschlichen Zellen um mehr als 500-fach erhöht werden⁵¹ und eine höhere Aktivität konnte auch in Reis bestätigt werden⁵². Effizienzsteigerungen, wenn doch auch kleinere, wurden auch beim Prime-Editing durch die Optimierung der Nukleasen und pegRNA Moleküle^{53,54} und beim Gene-Targeting durch die Verwendung neuer Nuklease Enzyme verzeichnet⁴⁶.

Eine der grössten Herausforderungen für die Genom-Editierung ist allerdings das unzureichende Wissen über die genetische Kontrolle komplexer Merkmale. So werden einzelne «Schlüsselgene» mit grossem Einfluss auf Wuchsform, Fruchtgrösse, Krankheitsresistenz oder Nährstoffgehalt recht gut verstanden. Doch Merkmale werden meist von mehreren Genen beeinflusst, von denen viele noch unbekannt sind. Solche polygenen Merkmale können zwar oft durch Editierung von einzelnen oder wenigen Schlüsselgenen stark verändert werden, doch müssten zur Merkmalsoptimierung viele verschiedener Gene gleichzeitig mutiert werden. Jedoch kann auch hier die Genom-Editierung die konventionelle Züchtung schon beschleunigen, indem polygene Merkmale durch gezielte Editierung von Schlüsselgenen rasch angepasst und dann durch Züchtung weiter verfeinert werden. Umgekehrt können konventionell gezüchtete Sorten durch das gezielte Einbringen von Schlüsselmutationen gezielt optimiert werden. Als Beispiel könnten schon jetzt Sorten mit polygenen Krankheitsresistenzen, die von wilden Verwandten eingekreuzt wurden, durch Genom-Editierung für agronomische Merkmale rasch optimiert werden. Darüber hinaus könnte durch Genom-Editierung gezielt die genetische Diversität in Genen und Genfamilien erhöht werden, die unter bestimmten Umweltbedingungen aktiv sind. Dieser Ansatz der «gezielten Mutagenesezüchtung» könnte Züchtungspopulationen generieren, aus denen unter verschiedenen Umweltbedingungen Individuen mit den besten Merkmalen und Genkombinationen selektiert werden. Es wird vor allem wichtig sein, bestehende Technologien miteinander zu kombinieren und zu integrieren.

Welchen Mehrwert bietet die Genom-Editierung für die Pflanzenzucht?

Die Genom-Editierung wird die traditionelle Züchtung nicht ersetzen, sondern eher ein weiteres Werkzeug im Repertoire des Züchters sein, um Mutationen zu erzeugen und miteinander zu kombinieren. Ein Mehrwert der Genom-Editierung besteht bereits, wenn die Anzahl der Generationen oder die Grösse der Zuchtpopulationen verringert werden kann, um Zeit und Kosten einzusparen. Schon jetzt ist die rasche Übertragung von gewünschten Mutationen und Merkmalen zwischen verschiedenen Sorten derselben Nutzpflanzenart möglich. In der konventionellen Züchtung geschieht dies durch Kreuzung und Selektion in den Folgegenerationen. Allerdings werden bei Kreuzungen nicht nur gewünschte sondern auch zahlreiche andere Mutationen übertragen, die durch zeitintensives Rückkreuzen nachträglich entfernt werden müssen. Durch Genom-Editierung können gewünschte Mutationen direkt in verschiedene Sorten eingebracht werden ohne andere Stellen des Genoms zu beeinflussen. Ein Beispiel hierfür ist die rasche Einführung einer Mutation in verschiedene Tomatensorten, um den Fruchtfall zu verringern^{55,56}. Durch das Übertragen von ausgewählten Mutationen könnten auch alte Sorten, die in Vergessenheit geraten sind, an heutige Ansprüche angepasst werden, ohne dabei deren vorteilhafte Sortencharakteristiken zu verlieren.

Eine viel diskutierte Anwendung der Genom-Editierung ist die Erhöhung der Diversität an verfügbaren Nutzpflanzen durch neue Arten. Derzeit wird der Grossteil des weltweiten Kalorienbedarfs durch nur eine Handvoll von Nutzpflanzen gedeckt, wodurch Ernährungssysteme anfällig gegenüber Umweltveränderungen werden. Um die Vielfalt an Nutzpflanzen zu erhöhen und an zukünftige Anforderungen anzupassen, könnten durch Genom-Editierung viele vorteilhafte Merkmale von Wildpflanzen oder alten Nutzpflanzen, die während der intensiven Züchtung verlorengegangen sind, wieder zugänglich gemacht werden. Ein Ansatz ist die «De-novo Domestizierung», bei

welcher gezielt Schlüsselgene der Domestizierung durch Genom-Editierung in Wildpflanzen verändert werden. So wurden schon Wuchsform, Fruchtgrösse, Blütenzahl und Nährstoffgehalt von wilden Tomaten durch Mutation von nur fünf Schlüsselgenen gezielt verbessert, ohne dabei die Resistenz gegen die Bakterielle Fleckenkrankheit zu verringern^{57,58}. Eine ähnliche Strategie wurde für Wildreis angewendet, um Sorten mit festen Rispen, grösseren Körnern und stabilen Halmen zu erzeugen³⁸. Für eine wilde Verwandte der Aubergine aus dem ariden Zentralaustralien wurde durch das Ausschalten eines einzelnen Gens, das die Bildung von Stacheln reguliert, die Ernte der Früchte erleichtert⁵⁹. Der Domestizierungsprozess, der für viele Nutzpflanzen mehrere Tausend Jahre benötigte, könnte so auf wenige Jahre verkürzt werden⁶⁰. Ein ähnlicher Ansatz ist die Verbesserung von sogenannten «Orphan Crops», Nutzpflanzen, die von der modernen Pflanzenzüchtung weitestgehend ignoriert wurden und nur als Nischenkulturen angebaut werden. Orphan Crops zeichnen sich oft durch niedrige Ansprüche, hohe Widerstandskraft und besondere Nährstoffprofile aus, jedoch meist auf Kosten von stark schwankender Produktivität und Qualität. Mit Genom-Editierung könnten solche agronomischen Merkmale rascher angepasst werden. So wurde die in Nordamerika heimische Blasenkirsche (*Physalis*) durch Genom-Editierung genetisch verändert, um Wuchsform und Fruchtgrösse zu verbessern und höhere Erträge zu ermöglichen²². Vergleichbare Ansätze könnten genutzt werden, um Qualität und Ertragspotential von Schweizer Nischenkulturen wie Buchweizen und Lupine zu stabilisieren und somit einen Beitrag zu einer grösseren Agrobiodiversität und Ernährungsvielfalt zu leisten.

Ausblick

Der Klimawandel und eine wachsende Weltbevölkerung stellen unsere Ernährungssysteme vor immense Herausforderungen. Die Landwirtschaft verlangt neue Pflanzensorten, die besser an verän-

derte Umweltbedingungen angepasst sind, nachhaltiges Wirtschaften erlauben, hochwertige Inhaltsstoffe liefern und trotzdem die nötigen Erträge erbringen. Um diesen Erwartungen gerecht zu werden, müssen verschiedene Ansätze in der Pflanzenzucht kombiniert werden, um die Sortenpalette für zukünftige Anforderungen zu erweitern. Die Genom-Editierung darf hier nicht ausgeklammert werden, da sie schon heute eine schnelle und effiziente Kombination von Mutationen ermöglicht.

Auch wenn Vorbehalte gegenüber der Grünen Gentechnik bestehen, dürfen wir nicht vergessen, dass Mutationen aus Genom-Editierung identisch zu den Mutationen sein können, die seit jeher zur Domestizierung und Züchtung von Pflanzen genutzt werden. Die Aufklärung dieser Faktenlage ist essenziell, um Züchter, Produzenten, Verbraucher und Entscheidungsträger bei ihrer Beurteilung der Genom-Editierung zu unterstützen. Züchtung beruht auf der gezielten Kombination von Mutationen, um Merkmale zu verändern und an menschliche Bedürfnisse anzupassen. Wir müssen verstehen, dass Nutzpflanzen menschengemacht und schon seit Jahrtausenden durch künstliche Selektion an unsere Vorgaben angepasst werden. Die Genom-Editierung ist nur ein weiteres Werkzeug, mit dem wir diese Selektion zielgerichteter betreiben können und unerwünschte Mutationen vermindern können. Auch wenn «Off-target» Mutationen bei Genom-Editierung entstehen können, ist deren Auftreten im Vergleich zu den spontanen Mutationen, die jeden Tag in Feldern und Gewächshäusern entstehen und in traditionellen Züchtungen vermischt werden, vernachlässigbar klein.

Daher ist es zu empfehlen, dass zumindest die Produkte der Genom-Editierung, die auf molekulargenetischer Ebene den traditionellen Züchtungen gleichen, auch rechtlich gleichzusetzen sind und nicht auf prozessspezifische Risiken geprüft werden müssen. Dadurch können aufwändige und kostenintensive Zulassungsverfahren verhindert werden und die Technologie auch kleineren Züchtungsunternehmen zugänglich gemacht werden.

Eine Fehleinschätzung des Potentials und Risikos der Genom-Editierung würde eine vielversprechende Zukunftstechnologie im Keim ersticken und weitere Innovationen in der Schweiz verhindern. Der Einsatz einer neuen Technologie birgt immer ein gewisses Risiko – sie nicht zu nutzen, kann jedoch ein noch größeres Risiko darstellen.

Referenzen

- 1 Wong, C. UK first to approve CRISPR treatment for diseases: what you need to know. *Nature* **623**, 676-677 (2023). doi.org/10.1038/d41586-023-03590-6
- 2 SCNAT. Stellungnahme zur Verlängerung des Gentechnik-Moratoriums, [scnat.ch/de/uuid/i/d3b0813b-3222-5fb5-9982-5c418cf2fe15-Stellungnahme_zur_Verl%C3%A4ngerung_des_Gentechnik-Moratoriums](https://www.scnat.ch/de/uuid/i/d3b0813b-3222-5fb5-9982-5c418cf2fe15-Stellungnahme_zur_Verl%C3%A4ngerung_des_Gentechnik-Moratoriums) (2021).
- 3 Leopoldina. Wege zu einer wissenschaftlich begründeten, differenzierten Regulierung genomeditierter Pflanzen in der EU. (2019).
- 4 Nasmyth, K. The magic and meaning of Mendel's miracle. *Nature Reviews Genetics* **23**, 447-452 (2022). doi.org/10.1038/s41576-022-00497-2
- 5 The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**, 635-641 (2012). doi.org/10.1038/nature11119
- 6 Appels, R. et al. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* **361** (2018). doi.org/10.1126/science.aar7191
- 7 Nurk, S. et al. The complete sequence of a human genome. *Science* **376**, 44-53 (2022). doi.org/10.1126/science.abj6987
- 8 Ossowski, S. et al. The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **327**, 92-94 (2010). doi.org/10.1126/science.1180677
- 9 Renaut, S. & Rieseberg, L. H. The Accumulation of Deleterious Mutations as a Consequence of Domestication and Improvement in Sunflowers and Other Compositae Crops. *Molecular Biology and Evolution* **32**, 2273-2283 (2015). doi.org/10.1093/molbev/msv106
- 10 Wang, X. et al. Genome of *Solanum pimpinellifolium* provides insights into structural variants during tomato breeding. *Nature Communications* **11** (2020). doi.org/10.1038/s41467-020-19682-0
- 11 IAEA. International Atomic Energy Agency - Mutant Variety Database, nucleus.iaea.org/sites/mvd/SitePages/Home.aspx (2023).
- 12 Wang, H. et al. Horizontal gene transfer of *Fhb7* from fungus underlies Fusarium head blight resistance in wheat. *Science* **368** (2020). doi.org/10.1126/science.aba5435
- 13 Zamir, D. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nat Rev Genet* **2**, 983-989 (2001). doi.org/10.1038/35103590
- 14 Zhou, Y. et al. Graph pangenome captures missing heritability and empowers tomato breeding. *Nature* **606**, 527-534 (2022). doi.org/10.1038/s41586-022-04808-9
- 15 Alonge, M. et al. Major Impacts of Widespread Structural Variation on Gene Expression and Crop Improvement in Tomato. *Cell* **182**, 145-161.e123 (2020). doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.021
- 16 EU-SAGE. www.eu-sage.eu/genome-search (2024).
- 17 Pompili, V., Dalla Costa, L., Piazza, S., Pindo, M. & Malnoy, M. Reduced fire blight susceptibility in apple cultivars using a high-efficiency CRISPR/Cas9-FLP/FRT-based gene editing system. *Plant Biotechnol J* **18**, 845-858 (2020). doi.org/10.1111/pbi.13253
- 18 Thomazella, D. P. d. T. et al. Loss of function of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118** (2021). doi.org/10.1073/pnas.2026152118

- 19 Kieu, N. P., Lenman, M., Wang, E. S., Petersen, B. L. & Andreasson, E. Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes. *Sci Rep* **11**, 4487 (2021). doi.org/10.1038/s41598-021-83972-w
- 20 Soyk, S. et al. Variation in the flowering gene SELF PRUNING 5G promotes day-neutrality and early yield in tomato. *Nat Genet* **49**, 162-168 (2017). doi.org/10.1038/ng.3733
- 21 Varkonyi-Gasic, E. et al. Mutagenesis of kiwifruit CENTRORADIALIS-like genes transforms a climbing woody perennial with long juvenility and axillary flowering into a compact plant with rapid terminal flowering. *Plant Biotechnology Journal* **17**, 869-880 (2018). doi.org/10.1111/pbi.13021
- 22 Lemmon, Z. H. et al. Rapid improvement of domestication traits in an orphan crop by genome editing. *Nature Plants* **4**, 766-770 (2018). doi.org/10.1038/s41477-018-0259-x
- 23 Kwon, C. T. et al. Rapid customization of Solanaceae fruit crops for urban agriculture. *Nat Biotechnol* **38**, 182-188 (2020). doi.org/10.1038/s41587-019-0361-2
- 24 Yang, T. et al. Recoloring tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex gene editing. *Hortic Res* **10**, uhac214 (2023). doi.org/10.1093/hr/uhac214
- 25 Wang, Y. et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* **32**, 947-951 (2014). doi.org/10.1038/nbt.2969
- 26 Li, S. et al. Genome-edited powdery mildew resistance in wheat without growth penalties. *Nature* **602**, 455-460 (2022). doi.org/10.1038/s41586-022-04395-9
- 27 Acevedo-Garcia, J., Kusch, S. & Panstruga, R. Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond. *New Phytologist* **204**, 273-281 (2014). doi.org/10.1111/nph.12889
- 28 Bessoltane, N. et al. Genome-wide specificity of plant genome editing by both CRISPR-Cas9 and TALEN. *Sci Rep* **12**, 9330 (2022). doi.org/10.1038/s41598-022-13034-2
- 29 Randall, L. B. et al. Genome- and transcriptome-wide off-target analyses of an improved cytosine base editor. *Plant Physiol* **187**, 73-87 (2021). doi.org/10.1093/plphys/kiab264
- 30 Tang, X. et al. A large-scale whole-genome sequencing analysis reveals highly specific genome editing by both Cas9 and Cpf1 (Cas12a) nucleases in rice. *Genome Biol* **19**, 84 (2018). doi.org/10.1186/s13059-018-1458-5
- 31 Xu, C. et al. A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nature Genetics* **47**, 784-792 (2015). doi.org/10.1038/ng.3309
- 32 Rodríguez-Leal, D. et al. Evolution of buffering in a genetic circuit controlling plant stem cell proliferation. *Nature Genetics* **51**, 786-792 (2019). doi.org/10.1038/s41588-019-0389-8
- 33 Rodríguez-Leal, D., Lemmon, Z. H., Man, J., Bartlett, M. E. & Lippman, Z. B. Engineering Quantitative Trait Variation for Crop Improvement by Genome Editing. *Cell* **171**, 470-480.e478 (2017). doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.030
- 34 Liu, L. et al. Enhancing grain-yield-related traits by CRISPR-Cas9 promoter editing of maize CLE genes. *Nat Plants* **7**, 287-294 (2021). doi.org/10.1038/s41477-021-00858-5
- 35 Zhou, J. et al. An efficient CRISPR-Cas12a promoter editing system for crop improvement. *Nat Plants* **9**, 588-604 (2023). doi.org/10.1038/s41477-023-01384-2
- 36 Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. & Liu, D. R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **533**, 420-424 (2016). doi.org/10.1038/nature17946
- 37 Gaudelli, N. M. et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* **551**, 464-471 (2017). doi.org/10.1038/nature24644
- 38 Yu, H. et al. A route to de novo domestication of wild allotetraploid rice. *Cell* **184**, 1156-1170.e1114 (2021). doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.013
- 39 Glaus, A. N. et al. Repairing a deleterious domestication variant in a floral regulator of tomato by base editing. *bioRxiv* (2024). doi.org/10.1101/2024.01.29.577624
- 40 Anzalone, A. V. et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* **576**, 149-157 (2019). doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4
- 41 Lin, Q. et al. Prime genome editing in rice and wheat. *Nat Biotechnol* **38**, 582-585 (2020). doi.org/10.1038/s41587-020-0455-x
- 42 Molla, K. A., Sretenovic, S., Bansal, K. C. & Qi, Y. Precise plant genome editing using base editors and prime editors. *Nat Plants* **7**, 1166-1187 (2021). doi.org/10.1038/s41477-021-00991-1
- 43 Perroud, P. F. et al. Improved prime editing allows for routine predictable gene editing in *Physcomitrium patens*. *J Exp Bot* **74**, 6176-6187 (2023). doi.org/10.1093/jxb/erad189
- 44 Puchta, H. & Fauser, F. Gene targeting in plants: 25 years later. *Int J Dev Biol* **57**, 629-637 (2013). doi.org/10.1387/ijdb.130194hp
- 45 Ghislain, M. et al. Stacking three late blight resistance genes from wild species directly into African highland potato varieties confers complete field resistance to local blight races. *Plant Biotechnol J* **17**, 1119-1129 (2019). doi.org/10.1111/pbi.13042
- 46 Schreiber, T. et al. Efficient scar-free knock-ins of several kilobases in plants by engineered CRISPR-Cas endonucleases. *Mol Plant* **17**, 824-837 (2024). doi.org/10.1016/j.molp.2024.03.013
- 47 Andersson, M. et al. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleo-protein delivery. *Physiol Plant* **164**, 378-384 (2018). doi.org/10.1111/pp1.12731
- 48 Debernardi, J. M. et al. A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants. *Nat Biotechnol* **38**, 1274-1279 (2020). doi.org/10.1038/s41587-020-0703-0
- 49 Maher, M. F. et al. Plant gene editing through de novo induction of meristems. *Nat Biotechnol* **38**, 84-89 (2020). doi.org/10.1038/s41587-019-0337-2
- 50 Imai, R. et al. In planta particle bombardment (iPB): A new method for plant transformation and genome editing. *Plant Biotechnol (Tokyo)* **37**, 171-176 (2020). doi.org/10.5511/plantbiotechnology.20.0206a
- 51 Richter, M. F. et al. Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. *Nat Biotechnol* **38**, 883-891 (2020). doi.org/10.1038/s41587-020-0453-z
- 52 Ren, Q. et al. PAM-less plant genome editing using a CRISPR-SpRY toolbox. *Nature Plants* **7**, 25-33 (2021). doi.org/10.1038/s41477-020-00827-4
- 53 Zhao, Z., Shang, P., Mohanraju, P. & Geijsen, N. Prime editing: advances and therapeutic applications. *Trends Biotechnol* **41**, 1000-1012 (2023). doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.03.004
- 54 Yan, J. et al. Improving prime editing with an endogenous small RNA-binding protein. *Nature* **628**, 639-647 (2024). doi.org/10.1038/s41586-024-07259-6
- 55 Lee, T. G., Klee, H. & Tieman, D. Field evaluation of CRISPR-Cas9-driven brachytic and jointless pedicel tomatoes identifies an association between the high extra-large-sized fruit yield of the brachytic-mediated shortened tomato and the jointless2. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* **64**, 511-516 (2022). doi.org/10.1007/s13580-022-00489-5
- 56 Soyk, S. et al. Duplication of a domestication locus neutralized a cryptic variant that caused a breeding barrier in tomato. *Nature Plants* **5**, 471-479 (2019). doi.org/10.1038/s41477-019-0422-z
- 57 Zsogon, A. et al. De novo domestication of wild tomato using genome editing. *Nat Biotechnol* (2018). doi.org/10.1038/nbt.4272
- 58 Li, T. et al. Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing. *Nat Biotechnol* (2018). doi.org/10.1038/nbt.4273
- 59 Satterlee, J. W. et al. Convergent evolution of plant prickles is driven by repeated gene co-option over deep time. *bioRxiv* (2024).
- 60 Purugganan, M. D. Evolutionary Insights into the Nature of Plant Domestication. *Current Biology* **29**, R705-R714 (2019). doi.org/10.1016/j.cub.2019.05.053

«Forschung für Leben» wurde 1990 gegründet. Der Verein informiert über die Ziele, Aufgaben und die Bedeutung der molekularbiologischen, medizinischen und pflanzenphysiologischen Forschung. Er ist bestrebt, auch ethische Fragen des mit diesen Bereichen verbundenen Fortschritts aufzugreifen und zu diskutieren.

Werden Sie Mitglied bei «Forschung für Leben»

elektronisch auf:

Einfach Klicken und Mitglied werden!

www.forschung-leben.ch/ueber-uns/mitgliedschaft/

oder per Schneckenpost an:

Verein «Forschung für Leben», 8000 Zürich
T +41 78 933 04 76, buch@forschung-leben.ch

IMPRESSUM

BioFokus

ISSN 2673-5040
31. Jahrgang

Herausgeber

«Forschung für Leben»

Autoren

Prof. Dr. Sebastian Soyk

Redaktion

Prof. Dr. Felix Ehrensperger
Dr. Iana Buch

Gestaltung

POMCANYS Marketing AG, www.pomcanys.ch

Geschäftsstelle

Verein «Forschung für Leben»
8000 Zürich
www.forschung-leben.ch

Bankverbindung

ZKB Wiedikon, IBAN: CH27 0070 0111 5012 7795 2