



Teil 3

Pflanzenzüchtung im Blickpunkt

Molekulare Züchtung: gezielte Veränderung einzelner Merkmale

Die Aufklärung der genetischen Grundlagen quantitativer Merkmale stellt einen Schlüssel zur Verbesserung unserer Kulturpflanzen und damit unserer wichtigsten Nahrungsquellen dar. Manche wichtige Züchtungsziele einschließlich ökologischer Verbesserungen sind derzeit nur mit gentechnischen Verfahren erreichbar. Dazu gehören Resistenzen gegen Krankheitserreger und Insekten sowie qualitative Verbesserungen.

Margit Laimer, Fatemeh Maghuly

Die Grüne Gentechnik verwendet gentechnische Verfahren im Bereich der Pflanzenzüchtung zur Herstellung transgener oder gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP). Sie unterscheidet sich von der herkömmlichen Züchtung dadurch, dass einzelne Gene gezielt transferiert und dabei Kreuzungshindernisse leichter überschritten werden können. Jede Pflanzenzelle enthält zwischen 20.000 und 60.000 Gene, deren Funktion bisher nur teilweise bekannt ist. Je nach Art variiert die Größe der Genome stark. So hat Arabidopsis das bisher kleinste bekannte pflanzliche Genom mit 1,25 x 10⁸ Basenpaaren (Bp), Weizen hat 1,6 x 10¹⁰ Bp (im Vergleich: Homo sapiens 3 x 10⁹ Bp). Unter der Annahme, dass ein Gen einer oder wenigen Seiten eines Buches mit einer bestimmten Anzahl von Buchstaben entspricht, entspricht ein durchschnittliches Genom einem Stapel von 1700 Büchern à 1000 Seiten (Abb. 1). Bei der herkömmlichen Kreuzungszüchtung wird jeweils das gesamte Erbgut der Elternorganismen (Spender rot, Empfänger grün) – sprich der Inhalt der beiden Buchstapel – gemischt und man erhält eine Vielzahl bunter Mischungen, deren Erbgut sich nicht exakt vorhersagen lässt. Das erfordert wiederholte Rückkreuzungen mit dem Empfänger-Elternteil, um mitübertragene unerwünschte Eigenschaften des Spender-Elternteils wieder zu eliminieren. Beim Gentransfer werden gezielt aus anderen Arten oder Organismen ein bis wenige Gene hinzugefügt, die für eine bestimmte Eigenschaft verantwortlich sind. Das entspricht der Übertragung einer oder weniger Seiten in einen Stapel von 1700 Büchern (Abb. 2). Die Methode ist gezielter, Veränderungen sind besser vorhersagbar und aufgrund der bekannten verwendeten Sequenz eindeutig nachweisbar. Auch lassen sich bestimmte Eigenschaften übertragen, die auf konventionellem Weg nicht einkreuzbar wären. Dass der genetische Code für alle Lebewesen universell gültig ist, wird in Diskussionen um Artengrenzen überschreitenden Gentransfer oft übersehen.

METHODEN DES GENTRANSFERS

Seit den 1980er Jahren existiert eine Reihe von Methoden zur Herstellung transgener Pflanzen. Dabei werden einzelne Erbfaktoren von Zellen eines Organismus in Zellen eines anderen übertragen. Zur Anwendung kommen vor allem drei Transfer-Methoden. Die Agrobacterium-vermittelte Gentransfermethode wurde in den 1980ern entwickelt. Agrobacterium tumefaciens ist ein pflanzenpathogenes Bodenbakterium,

das mit Hilfe seines extrachromosomalen Plasmids Gene in das pflanzliche Genom integriert. Ersetzt man die „Wildtyp-Sequenzen“ in einem „entwaffneten“ Plasmid mit Fremdgenen, kann man damit gezielt Gene in „sense“ und „antisense“-Orientierung in die Pflanze einbauen und somit hinauf- oder hinunterregulieren. Der biolistische Ansatz ist eine direkte, rein mechanische Methode. Dabei wird DNA auf Gold- oder Wolframpartikel aufgebracht, die mit Hilfe einer Genkanone in die Zellen geschossen werden. Da die Partikel sehr klein sind, bleiben Zelle und Zellwand weitgehend unbeschädigt. Bei der Protoplastentransformation erhält man zunächst durch enzymatischen Verdau der Zellwände nur von einer Zellmembran umgebene Protoplasten. Für den Gentransfer wird diesen Protoplasten entweder Polyethylenglykol hinzugefügt oder ein kurzer Stromstoß (Elektroporation) versetzt, wodurch die Membran durchlässig und DNA in die Pflanzenzelle aufgenommen wird. Die Methode ist zwar bei allen Pflanzen anwendbar, allerdings ist es schwierig, aus Protoplasten wieder Pflanzen zu regenerieren.

ZÜCHTUNGSZIELE

Durch Gentransfer können gewünschte Merkmale direkt in Pflanzen übertragen werden, etwa veränderte agronomische Eigenschaften, die den Anbau der Pflanzen erleichtern (Input Traits). Gentechnisch verbesserte herbizid-, schädlings-, pilz- und virusresistente Pflanzen der ersten Generation können den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln, Energie, Zeit und Geld reduzieren. Auch den Einsatz von Düngemitteln hofft man langfristig zu verringern, damit Böden und Gewässer entlastet und Lebensmittel umweltgerecht produziert werden können. Daneben haben sogenannte Output Traits mit veränderter Produktqualität (neue Inhaltsstoffe und veränderte Eigenschaften) die KonsumentInnen und die Industrie als Zielgruppen. Ernährungsphysiologisch optimierte Produkte werden in Zukunft an

Bedeutung gewinnen. Auch zur Reduktion von Lebensmittelallergien wird die Gentechnologie beitragen. Mit ihrer Hilfe können Allergene in Lebensmitteln untersucht, inaktiviert oder entfernt werden. GVP der zweiten Generation zielen auf die Verbesserung von Nährstoffgehalt und Verarbeitungsqualität, z.B. Erhöhung des Gehalts von Omega-3-Fettsäuren, Erhöhung und Veränderung des Zuckergehalts oder bessere Farbeigenschaften. Biofortifikation, die Anreicherung mit Nährstoffen, ist unter anderem mit gentechnischen Methoden möglich. In den 1990er Jahren wurde von Ingo Potrykus und Peter Bayer durch Einführung von drei Genen zur Carotenoidsynthese die Reissorte Golden Rice erzeugt, die deutlich mehr Beta-Karotin, eine Vorstufe zu Vitamin A, und Eisen enthält. In Ländern, in denen Reis das Hauptnahrungsmittel ist, kann damit weit verbreiteten Mangelkrankungen begegnet werden. Die an der Entwicklung beteiligte Firma Syngenta verzichtet bei humanitären Projekten auf Lizenzzahlungen. Golden Rice der 2. Generation befindet sich in Bangladesch und auf den Philippinen im Zulassungsverfahren. Eine Markteinführung könnte in absehbarer Zeit erfolgen. GVP der dritten Generation sollen Industrierohstoffe (Biokraftstoffe, biologisch abbaubares Plastik, Enzyme oder Schmieröle) oder pharmazeutische Produkte wie Hormone, Impfstoffe oder Antikörper liefern.

ANBAU

Zu Beginn der 80er Jahre nahm die Gentechnologie im Bereich der Pflanzenzucht ihren eigentlichen Aufschwung. Bei der 1994 als erstes GVO-Nahrungsmittel in den USA zugelassenen Flavr-Savr-Tomate wurde durch Antisense-Strategie ein Gen für die Bildung des Reife-Enzyms Polygalakturonase blockiert, wodurch die Früchte länger haltbar wurden. Nach einem Verkaufspeak 1998 wurden die Pflanzen wegen mangelnder Rentabilität vom Markt genommen. In England wurde etwa zeitgleich Tomatenmark aus gv-Tomaten ein

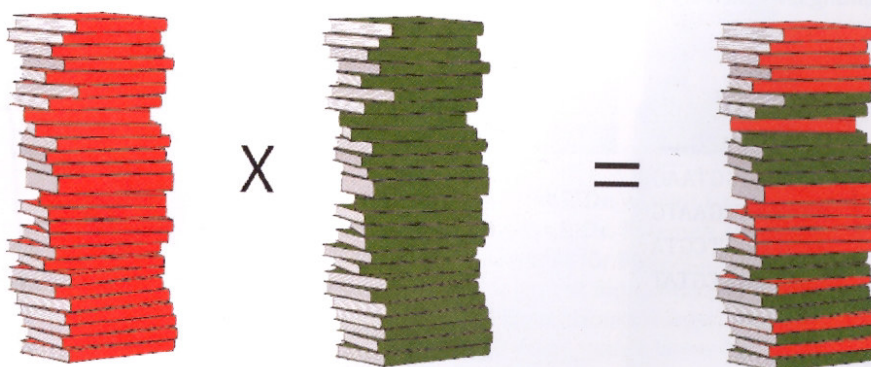


Abb. 1: Durchmischung genetischer Eigenschaften bei der herkömmlichen Kreuzungszüchtung

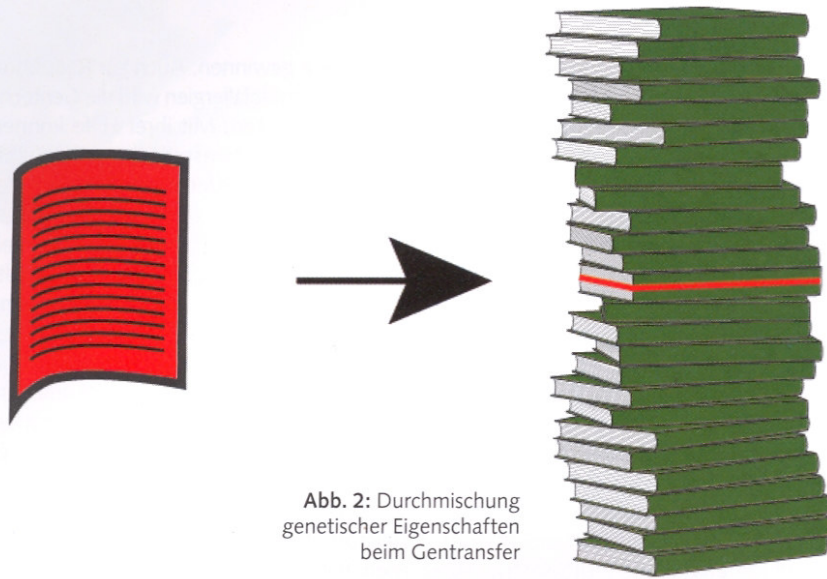


Abb. 2: Durchmischung genetischer Eigenschaften beim Gentransfer

großer Erfolg, der gv-Ursprung der Tomaten war eindeutig auf dem Etikett angegeben. Eine Zulassung nach EU-Rechtsvorschriften zur Gentechnik wurde beantragt und 2002 zurückgezogen. In den Früchten von Arctic Granny and Arctic Golden von Okanagan Specialty Fruits Inc. (Kanada) wird durch Gen-Silencing die Expression von Polyphenoloxidasen (PPO) reduziert, was die Verbräunung des Fruchtfleisches verhindert. Im Februar 2015 wurde für diese beiden Sorten der Deregulierungsstatus erteilt, d.h. sie werden demnächst auf dem Markt angeboten. Die weltweite kommerzielle Anbaufläche von GVP hat sich von 1,7 Millionen Hektar im Jahr 1996 bis 2012 auf über 170 Millionen Hektar vergrößert. Weltweit fand 2014 der Anbau in 28 Ländern durch 18 Millionen Landwirte (davon mehr als 90% in Entwicklungsländern) auf 181 Millionen Hektar statt (James, 2014). Die Akzeptanz für GVP gerade im Lebensmittel- und Futtermittel-Bereich ist in Europa, und besonders in Deutschland und Österreich, gering. Seit 2013 werden in Deutschland keine GV-Pflanzen mehr angebaut, auch nicht zu Versuchszwecken (Freisetzungsversuche). In Österreich wurden Freisetzungen nicht einmal zu Forschungszwecken zugelassen. Weltweit

sind hunderte verschiedene gentechnisch veränderte Pflanzen zugelassen (Stand: März 2000). Mit Jänner 2016 haben in der EU 32 gv-Maislinien, 12 gv-Sojabohnenlinie, 4 gv- Rapslinien, 1 gv-Zuckerrübe sowie 10 gv-Baumwoll-Linien das Zulassungsverfahren durchlaufen (http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm). Dabei wird deutlich zwischen der Zulassung zum Import und der Zulassung zum Anbau unterschieden. Im Mittelpunkt der weltweiten Anwendung der Grünen Gentechnik stehen bisher vier Agrarpflanzen (Anteil GVO 2014): Soja (>80%), Baumwolle (68%), Mais (30%) und Raps (25%), die entweder mit Herbizidtoleranz (57%), Insektenresistenz (15%) oder beidem (28%) ausgestattet sind. So wurden 2014 weltweit auf 90,7 von 111 Millionen Hektar (82 %) gv-Sojabohnen angebaut. In der EU sind sie seit 1996 zum Import und zur Weiterverarbeitung genehmigt und haben damit über Lebensmittel und Futtermittel Einzug in die menschliche Nahrungskette gehalten. Neben diesen vier Pflanzen werden derzeit nur wenige gentechnisch veränderte Pflanzen global vermarktet. Auf kleinen Flächen werden in den USA und Kanada gv-Zuckerrüben, gv-Luzerne und gv-Papaya angebaut, die

vor allem durch öffentliche Forschung entwickelt wurden und neben den großen „Commodity crops“ nur eine sekundäre wirtschaftliche Bedeutung haben. Diese Konzentration resultiert aus der Tatsache, dass die Entwicklung von neuen GVP zeit-, kosten- und wissensintensiv ist. Vor der Zulassung neuer transgener Sorten müssen jahrelange Versuchsreihen durchgeführt werden, die durchschnittlich ca. 13 Jahre von der Entwicklung bis zur Zulassung und 136 Million Dollar benötigen. Diese hohen Kosten reduzieren die Innovationsraten und behindern insbesondere die Entwicklung von gv-„minor crops“. Die hohen Kosten tragen auch zu einer Konzentration der Saatgutindustrie bei, da sich öffentliche Forschungseinrichtungen die Summen nicht leisten können. 2014 wurden die ersten Pflanzen in Kanada und den USA für den Anbau zugelassen, die mit Hilfe neuer Gentechnik-Methoden, dem sogenannten „genome editing“, entstanden sind. Solche Pflanzen enthalten keine artfremde Erbinformation (Transgene). Bei der neuen Kartoffel-Sorte entstehen 75 Prozent weniger Acrylamide beim Frittieren. Die zweite zugelassene Pflanze ist eine Luzerne, deren Anteil an schwerverdaulichem Lignin in den Zellwänden vermindert wurde, wodurch die neue Sorte als Viehfutter besser verdaulich wird.

SMART BREEDING

In den letzten 10 Jahren ist eine Reihe neuer Methoden zur molekularen Züchtung hinzugekommen. So definiert man die Transformation als Cisgenese, wenn das Gen oder die regulatorischen Sequenzen von einer mit der Empfängerpflanze natürlich kreuzbaren Art stammen. Die genetische Modifikation war auf natürliche Gene (inclusive Introns, nativer Promotoren sowie Terminatorsequenzen) in sense-Orientierung eingeschränkt. Pfropfen ist eine klassische Methode in der Pflanzenzucht vor allem bei Zier- und Obstgehölzen. In der modernen Pflanzenzüchtung wird auf eine gv-Unterlage mit verbesserten Eigenschaften (z.B. Krank-



Abb. 3: Durchmischung genetischer Eigenschaften beim Gene Editing

ZEITAFEL DER PFLANZENZÜCHTUNG

Zeitraum	Methoden
vor 1900	Auswahl vorhandener Varianten, gezielte Auswahl von Pflanzen
ab 1900	Gezielte Kreuzungen für genetische Variation, Hybridsorten
ab 1950	Ungerichtete Mutationszüchtung mittels Radioaktivität (Gamma-Strahlen)
ab 1960	Zell- und Gewebekulturen, Protoplastenfusion
ab 1978	Transgenese = Übertragung einzelner selektierter artfremder Gene in sense- oder antisense-Orientierung, RNA-Interferenz
ab 2005	SMART BREEDING Techniken: Cisgenese (Übertragung einzelner selektierter Gene in kreuzbare, verwandte Pflanzen), Intragenese (Übertragung einzelner selektierter Gene aus derselben Art), Agroinfiltration, Pfropfung, RNA-abhängige DNA-Methylierung (RdDM), Synthetische Biologie
ab 2010	GENOME EDITING Techniken: Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese, Zink-fingernuklease-Technik (ZFN-1; ZFN-2; ZFN-3), TALENs, CRISPR-Cas9

Quelle: modifiziert nach Jany und Kellmann 2015

heitsresistenz, verbesserte Bewurzelung) ein konventionell gezüchtetes Edelreis gepfropft. Prinzipiell sind Pflanzen aus einer gv- Unterlage und einem herkömmlichen Edelreis Chimären, welche als GVP eingestuft werden. Da aber das Edelreis nicht gentechnisch verändert wurde, sind auch die Nachkommen und Produkte (Samen, Früchte) nicht gentechnisch verändert. Gv-Wurzelstöcke wurden bereits bei verschiedenen Baumarten, etwa bei Apfel, Birne, Orange und Rebe, entwickelt. Ermöglichten die ursprünglichen Methoden einen Gentransfer mit zufälliger Integration ins Genom, so erlauben die neuen Genom-Editing Methoden (GE) einen Gentransfer mit zielgenauen Veränderungen im Genom. Beim GE werden bestimmte kurze Abschnitte oder einzelne Basenpaare im Erbgut von Zellen gezielt angesteuert und – an Ort und Stelle – optimiert. Mit Hilfe dieser Techniken können also punktgenaue Veränderungen in der Erbinformation – Buchstabe für Buchstabe – vorgenommen werden, als wäre sie ein Text in einem Schreibprogramm (Abb. 3). Der wesentliche Unterschied zu den bereits zugelassenen GVOs ist, dass die neuen Züchtungstechniken in der Regel keine artfremden Gene in die Pflanze einbringen, sondern Gene, die bereits in der Pflanze vorhanden sind, verbessern. Der Ansatz des GE nutzt die Fähigkeit bestimmter Enzyme, Erbsubstanz an spezifischen Stellen aufzuschneiden und anschließend punktgenau durch zelleigene Reparaturmechanismen instand zu setzen, jedoch nicht ohne zuvor eine gezielte Veränderung des Gens vorzunehmen. Basis dieser „cut-and-repair“-Systeme sind sogenannte Nukleasen, etwa die Meganukleasen, Zinkfingernukleasen, TALEN-Effektoren und der Enzyme der CRISPR – Cas 9 (Clustered Regularly

Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR ASSOCIATED protein number nine) Systeme. CRISPR steht für eine Sequenz mit sich wiederholenden DNA-Abschnitten in Bakterien, die kurze DNA-Stücke von Viren enthalten. Das wird mit Hilfe der sogenannten „guide RNA“ (=Schnitt-mustervorlage, die beschreibt, wo genau im DNA-Faden sie schneiden soll) an seine Ziel-DNA geleitet und schneidet diese exakt an der vorgegebenen Stelle.

Die CRISPR-CAS-Technologie nutzt dieses Schneiden zusammen mit der DNA-Reparaturmaschinerie von Zellen, um Mutationen gezielt zu erzeugen oder aber alternative DNA-Fragmente an der Schnittstelle einzufügen.

Die durch GE erzeugten Mutationen unterscheiden sich nicht von Veränderungen, die in der Natur vorkommen oder mit Hilfe der klassischen Züchtung erzeugt werden. Einziger Unterschied ist, dass diese bewusst auf ein Zielgen ausgerichtet werden. Durch die Sequenzierung der DNA kann die Veränderung eines Gens nachgewiesen werden. Jedoch kann nicht nachgewiesen werden, durch welche Methode diese Veränderung entstanden ist. Bei Weizen, der gegen Mehltau resistent gemacht wurde, wurden mit der neuen Methode gleichzeitig drei Gene verändert, was mit klassischen Methoden der Gentechnik oder Züchtung nicht möglich gewesen wäre. Jede einzelne Genveränderung ist minimal und hätte in der Natur auch von selbst auftreten können, statistisch gesehen aber wäre es höchst selten, dass alle drei Mutationen in der Natur gleichzeitig aufgetreten wären.

ZULASSUNG UND KENNZEICHNUNG

Es gibt kein weltweit einheitliches Ver-

fahren für die Zulassung von GVP zum Anbau oder zur Verwendung als Lebensmittel und Futtermittel. Jedes Land hat seine eigenen Gesetze dazu. In der EU werden Lebensmittel mit Gv-Anteil aufgrund des Herstellungsprozesses als neuartige Lebensmittel behandelt (prozessbezogen). Ein neues Gv-Produkt gilt unabhängig von seiner Zusammensetzung zunächst als riskant, bis ausreichende Tests durchgeführt wurden, um seine Sicherheit zu gewährleisten. Lebensmittel mit Gv-Anteil werden in den USA und in Kanada wie Lebensmittel ohne Gv-Anteil behandelt, wenn dieselbe Zusammensetzung im Endprodukt besteht (produktbezogen). Seit über 25 Jahren Forschung gibt es keine wissenschaftlichen Hinweise dafür, dass gentechnisch veränderte Pflanzen mit höheren Risiken für die menschliche Gesundheit verbunden seien als konventionelle. Diese Auffassung wird weltweit von führenden Wissenschaft- und Gesundheitsorganisationen vertreten. Obwohl bei keinem der über 38.000 Freisetzungsexperimente, die bislang weltweit durchgeführt wurden, ungewöhnliche Folgeerscheinungen transgener Pflanzen im Vergleich zu herkömmlichen Pflanzen beobachtet wurden, und obwohl es bei keinem Verarbeitungsprodukt zu unvorhergesehenen Ereignissen kam, dauert die Diskussion über hypothetische Risiken weiter an. Daher fordern Wissenschaftler schon länger, dass als Entscheidungsbasis für oder gegen den Anbau einer neuen Pflanze diese selbst einer eingehenden Prüfung zu unterwerfen sei, und nicht die Methode, mit der in ihr Erbgut eingegriffen wurde. Ob nämlich eine genetische Anpassung mittels chemischer, physikalischer oder biologischer Verfahren erreicht wurde, ist unerheblich.

Gewidmet: KR ÖR Hon. Prof. Dipl.-Ing. Dr. Heinz Wohlmeyer zum 80. Geburtstag.



Margit Laimer



Fatemeh Maghuly

Univ.-Prof. Dr. Margit Laimer,
Univ.-Doz. Dr. Fatemeh Maghuly,
Universität für Bodenkultur Wien,
Department Biotechnologie, Abteilung
für Pflanzenbiotechnologie, Muthgasse 18,
1190 Wien, margit.laimer@boku.ac.at

Literatur bei den Verfasserinnen.