



**JKI**

**Julius Kühn-Institut**

Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen  
Federal Research Centre for Cultivated Plants

# **Anwendung neuer Techniken der Genom-Modifikation in der Pflanzenzüchtung**

**Joachim Schiemann, Frank Hartung & Thorben Sprink**

**BfR-Symposium**

**Neue Technologien zur Modifikation des Genoms -  
Möglichkeiten, Grenzen und gesellschaftliche Herausforderungen  
6. Dezember 2016, Berlin**

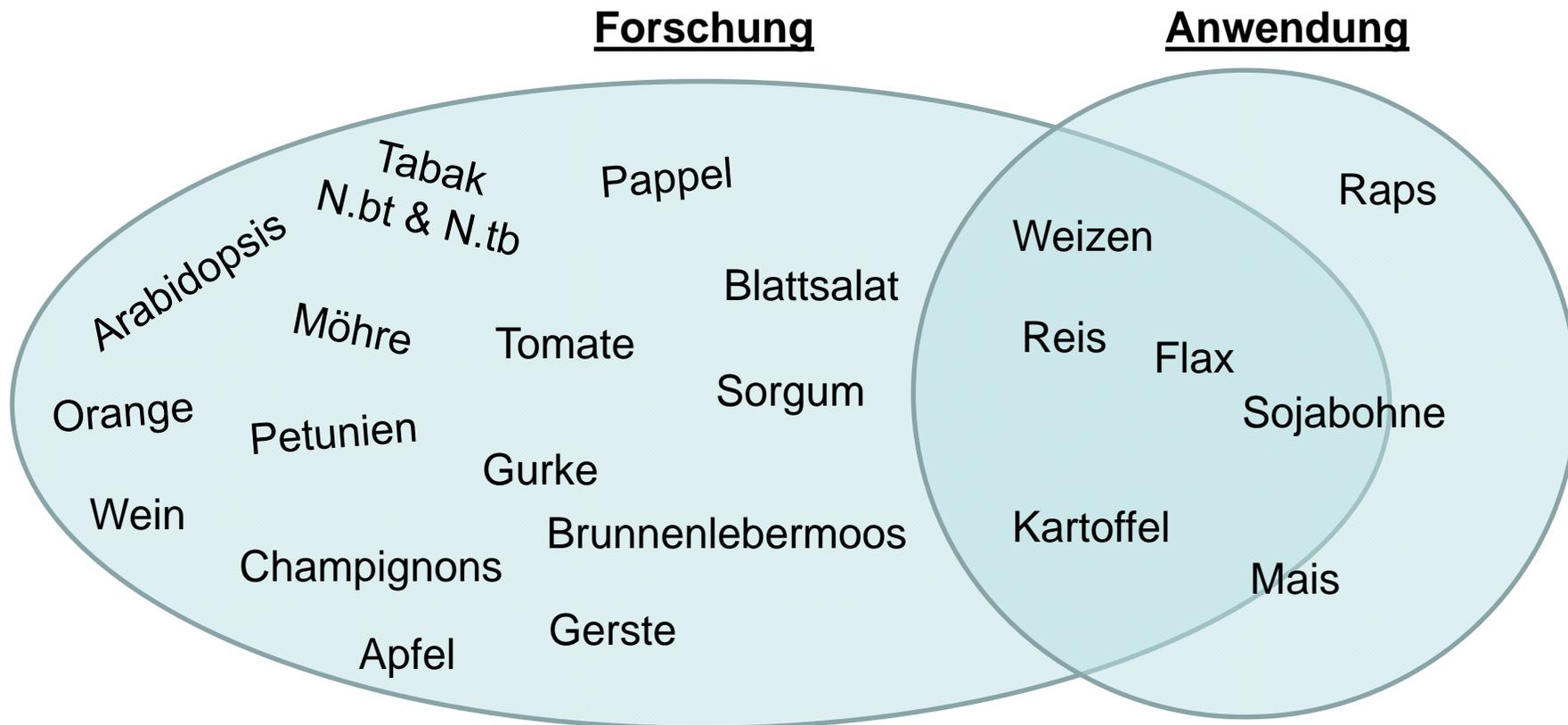
# Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen



## Institut für die Sicherheit biotechnologischer Verfahren bei Pflanzen



Stand: November 2014





Neben dem Oligonukleotid-gerichteten Mutagenese-Verfahren sind insbesondere noch die folgenden Sequenz-spezifischen Nukleasen beim Genome Editing von Pflanzen im Einsatz:

- (i) CRISPR/Cas9 und weitere RNA-gesteuerte Nukleasen
- (ii) Zink Finger Nukleasen
- (iii) TALENs
- (iv) Meganukleasen



Virus-resistente Gurken durch Ausschalten des eukaryotic translation initiation factors (eIF4E) (Chandrasekaran et al., 2016)

Nachahmen einer **natürlich vorkommenden** Mutation mittels stabiler CRISPR/Cas9 Transformation



3x Rückkreuzung, „Off-Target Test“  
Testung auf Transgenstatus,  
Resistenztests

„Nicht-transgene“ Virus-resistente Gurken  
(Potyviren + Impomoviren)



Mehltau-Resistenz durch die Veränderung aller drei Homoallele beim Weizen

TALEN-Ansatz, um alle drei Allele mit einem TALEN-Paar auszuschalten

Nur bei Veränderung aller drei Allele: Resistenz  
→ erfolgreich, stabile Resistenz durch Ausschalten des MLO-Gens (Wang et al., 2014)



Gluten-freier Weizen mittels TALEN und CRISPR/Cas9 (Calyxt, DuPont)

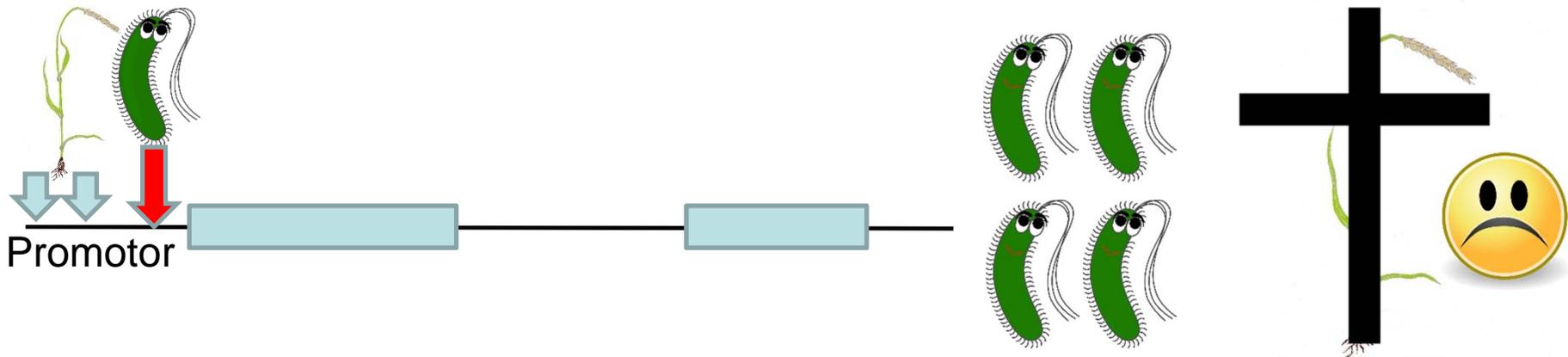
Pseudo-Hybride mittels CRISPR (DuPont)

Trockentoleranz bei Weizen (DuPont)

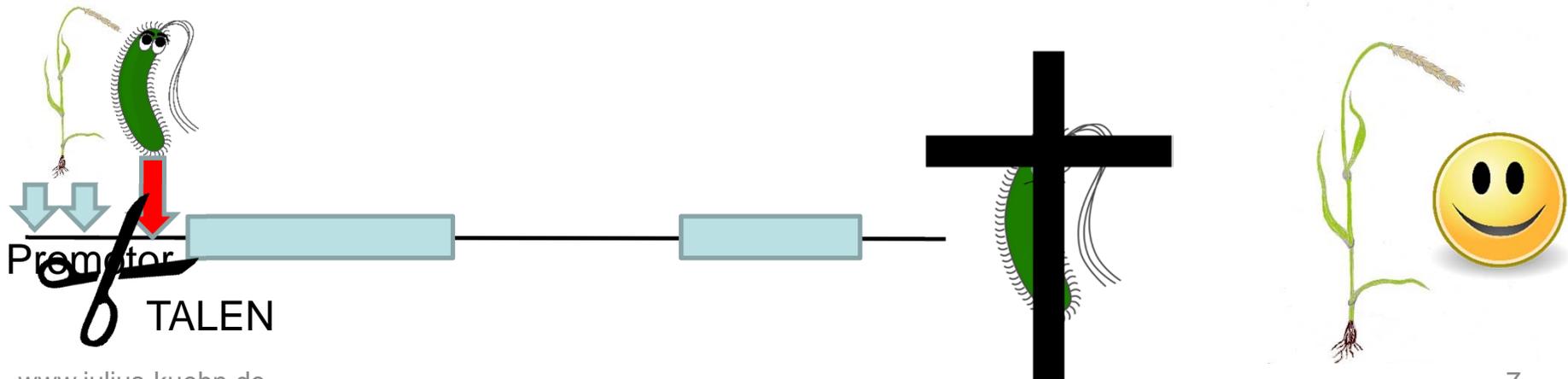
<http://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1233234>

# Das gekaperte Gen - Veränderungen im UTR

Bakterien kapern den Zuckertransporter OsSWEET14 bei Reis für ihre Zwecke und nutzen den Zucker für das eigene Wachstum



TALEN schneidet in einem von der Pflanze nicht benötigten Promotorbereich - die Bakterien können nicht mehr kapern (Li et al., 2012)



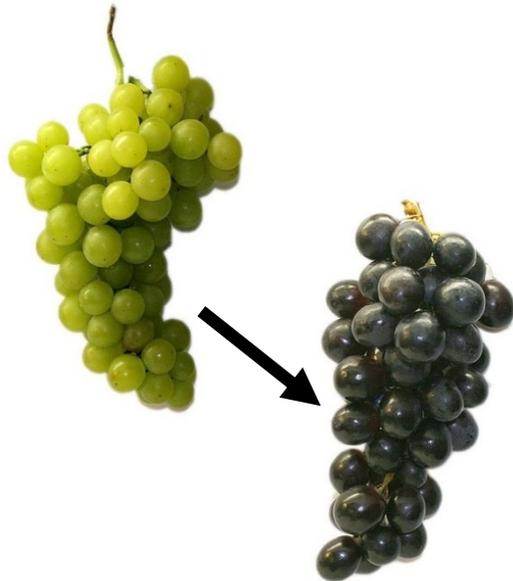
# Ansätze in Japan (mittels CRISPR/Cas9)



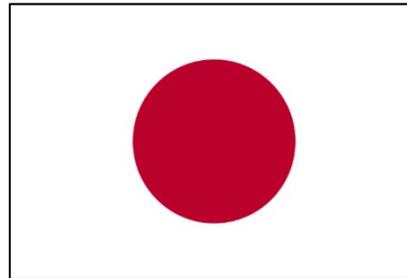
Süßer + langlebiger



Weniger Allergene (Globulin)



Farbveränderung etablierter Sorten



Zucht-geeigneter Thunfisch

## Werde ich reguliert – wenn ja, wie ?



Um die rechtliche Einordnung der neuen Techniken gibt es derzeit heftige Diskussionen.

Aber auch darum, ob eine genetisch veränderte Pflanze überhaupt reguliert ist (zumindest in den USA).

## Werde ich reguliert – wenn ja, wie ?



Technology	Anzahl der Anfragen (Mai 16)	Erste Anfrage
Zink Finger Nukleasen	1254	Mai 2006
TALEN	19	März 2011
CRISPR/Cas9	139	Juni 2012

**Anfrage zu Genome Editing beim USDA**  
(Quelle: USDA Aphis)

# Werde ich reguliert – wenn ja, wie ?



Wachsmais	Stärke	CRISPR/Cas	DuPont Pioneer	Bescheid: kein GVO	Markteinführung in fünf Jahren
Speisepilze	nicht braun anlaufend	CRISPR/Cas	Penn State	Bescheid: kein GVO	Vermarktung unklar
Weizen	Resistenz gegen Mehltau	TALEN	Calyxt	Bescheid: kein GVO	Freilandversuche
Weizen	weniger Gluten	TALEN	Calyxt	noch kein Antrag gestellt	Forschung
Sojabohnen	weniger Trans-Fettsäuren	TALEN	Calyxt	Bescheid: kein GVO	Freilandversuche
Kartoffeln	Produkte weniger Acrylamid	TALEN	Calyxt	Bescheid: kein GVO	Freilandversuche
Ananas	rosa Farbe	Gentechnik	Del Monte	USDA: keine Zulassung als GVO erforderlich	Freilandversuche
Hirse	Optimierung Bioenergie	Gentechnik	Ceres	USDA: keine Zulassung als GVO erforderlich	auf dem Markt

Quelle: <http://www.transgen.de/aktuell/2569.usa-crispr-pflanzen-gentechnik.html>

Stand 4/2016

# Werde ich reguliert – wenn ja, wie ?



DuPont  
Wachs-Mais  
CRISPR  
K.O. Waxy Gen  
nicht reguliert  
nach 7 CFR part  
340



Penn State  
Champignon  
CRISPR  
K.O. PPO  
nicht reguliert  
nach 7 CFR part  
340



Calyxt  
Sojabohne  
TALEN  
weniger Transfette  
nicht reguliert  
nach 7 CFR part  
340

## Nur etwas für „global player“ ?



### KWS

Zuckerrübe?!

Zink Finger

### DuPont

Caribou Biosciences (Doudna)

Weizen und Mais

CRISPR

### Bayer/Monsanto

Broad Institute (Zhang)

Mais, Soja, Baumwolle

MN, CRISPR

### Collectis (Calyxt)

Dan Voytas

Kartoffel, Soja, Weizen

TALENs

### Dow AgroSciences

Zusammenarbeit mit Monsanto + KWS

Mais

Zink Finger

**Kleine Firmen, Nischenkulturen,  
Ökolandbau etc... ?!**

## Nur etwas für „global player“ ?



Der Bedarf im Ökolandbau nach neuen Resistenzen und Alternativen zu den verwendeten Pflanzenschutzmitteln ist hoch, wie aktuelle Fälle aus 2016 zeigen ...

**Pfalz:** Durch die feuchte Witterung im Frühjahr und Frühsommer extrem hohe Belastung durch Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel; Kupfer hilft nur bedingt, da es schnell wieder abgewaschen wurde ...

→ Massive Ernteaufälle bis 100% im Bioanbau

**Bioweinbau:** Starke Ernteeinbußen (ca. 35%); hoher Befallsdruck durch falschen Mehltau im Mai und Juni, dadurch bis zu **15** Kupferbehandlungen nötig - trotzdem massive Ausfälle

**Urs Niggli:** CRISPR/Cas hat großes Potenzial. Sie hat aber wie jede Technologie auch Risiken und kann falsch verwendet werden. Das sollte man für jede Anwendung einzeln bewerten, statt diese Technik generell abzulehnen. Ich weiß jetzt schon Anwendungen, die Sinn machen. Man muss schauen, wie die Risiken im Vergleich zu denen anderer Lösungen für die Probleme sind, bei denen man sie einsetzen will.

**Urs Niggli:** Man kann zum Beispiel Gene für Krankheitsanfälligkeit ausschalten oder Resistenzgene aus der verwandten Wildpflanze wieder in moderne Sorten einführen. Das sind Eigenschaften, die zum großen Teil durch die Züchtung auf Ertrag oder Qualität in den letzten hundert Jahren verloren gegangen sind. Da könnte man tatsächlich in großem Maßstab Pestizide einsparen.

### Der Bio-Papst sagt: Gentechnik kann öko sein



**LANDWIRTSCHAFT**  
**Keine Angst: Die neue Gentechnik-Methode CRISPR/Cas sei eine große Chance auch für Ökobauern, erklärt der wichtigste Biolandbau-Wissenschaftler Urs Niggli**

# To be, or not to be a GMO, that is the question



“There is no evidence that GM technologies are any riskier than conventional breeding technologies and this has been confirmed by thousands of research projects.”

“Finally, we shouldn't forget that there are also other promising novel plant breeding technologies, post-GM, and we shouldn't make the mistake of regulating them to death as we have done with GM.”



<https://www.flickr.com/photos/securitydefenceagenda/8232274476>

*Anne Glover, former Chief Scientific Adviser to the President of the European Commission*

## New techniques working group:

- Durch Mandat der EU-Kommission etabliert im Oktober 2007
- Zwei Experten pro Mitgliedsstaat
- Bewertung der neuen Techniken im Kontext zur GVO-Gesetzgebung
- Abschlussbericht Frühjahr 2012

+ Joint Research Center Studie über die [Entwicklung und Anwendung](#) dieser Techniken durch die kommerzielle Züchtung (Lusser et al., 2011)

Techniken, die von der GVO-Regulierung ausgeschlossen werden sollten [Annex IB (2001/18/EC) and Annex II part A (2009/41/EC)]:

- Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese (ODM)
- Zink Finger Nukleasen (ZFN-1 und -2) (ohne Einführung rekombinanter DNA)
- Nachkommen und Produkte aus Pfropfungen mit nicht-GV Pfropfreis
- Nachkommen von Pflanzen erzeugt durch transiente Agro-Infiltration “sensu stricto”
- Durch RNA-abhängige DNA-Methylierung erzeugte Pflanzen ohne vererbare Veränderungen in der DNA
- Nachkommen aus dem Reverse Breeding  
Null-Segreganten ?

Entschließung des Europäischen Parlaments „Technische innovative Lösungen für eine nachhaltige Landwirtschaft“ vom 7. Juni 2016 (s. die Ausführungen zur Präzisionszucht): Veröffentlichung des Abschlussberichts wird gefordert

Was passiert, wenn ich den Kontext negiere?



Was passiert, wenn ich den Kontext negiere?



# Wie verändert man das Genom einer Pflanze?



- Kreuzung mit anderen Pflanzen (züchterischer Genpool)  
(nahe bis ferne Kreuzungen (mit Zwischenstufen) möglich)
- Protoplastenfusion von schwer kreuzbaren Arten
- Physikalische oder chemische Mutagenese, somaklonale Variation
- Transformation mit T-DNA oder Transposonen (klassische Gentechnik)
- Einsatz kurzer DNA-Stücke (ODM)
- Einsatz von sequenzspezifischen Nukleasen (z.B. CRISPR/Cas)

# Wie verändert man das Genom einer Pflanze?



- Kreuzung mit anderen Pflanzen (züchterischer Genpool)  
(nahe bis ferne Kreuzungen (mit Zwischenstufen) möglich)
- Protoplastenfusion von schwer kreuzbaren Arten
- Physikalische oder chemische Mutagenese, somaklonale Variation
- Transformation mit T-DNA oder Transposonen (klassische Gentechnik)
- **Einsatz kurzer DNA-Stücke (ODM)**
- **Einsatz von sequenzspezifischen Nukleasen (z.B. CRISPR/Cas)**

# Beginn der Debatte um Genome Editing

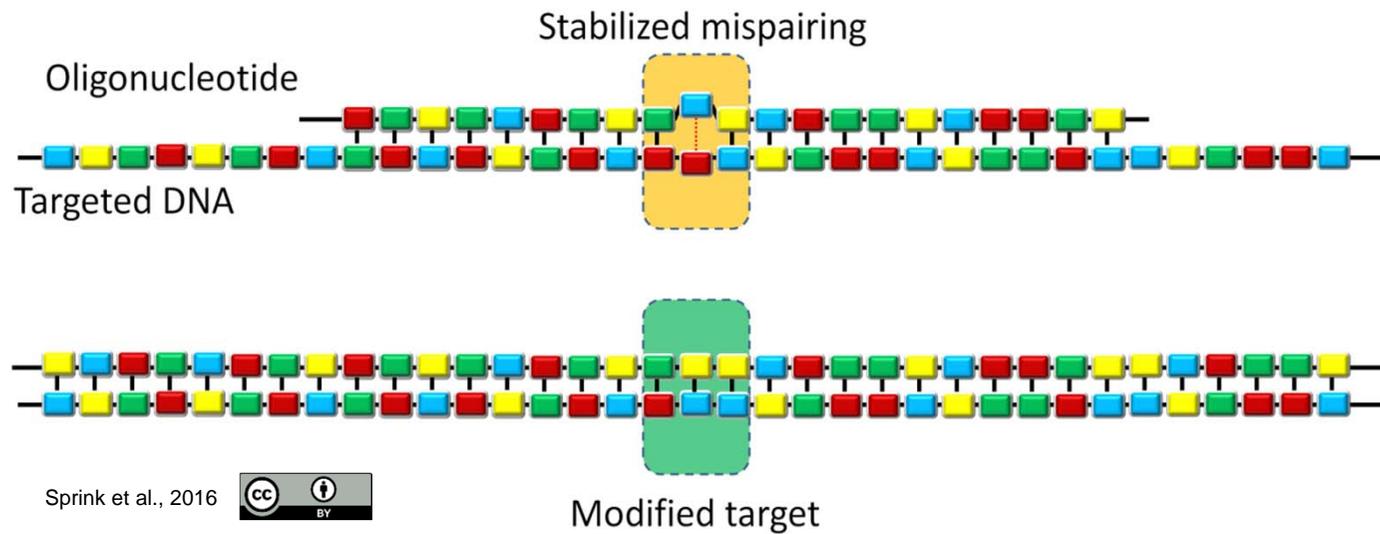


Genetische Veränderungen durch Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese haben die Diskussion um die neuen Techniken in Deutschland und Europa angeregt, besonders der ODM Raps von CIBUS™



# ODM oder auch RTDS

Sequenz-spezifische Induktion einer Punktmutation (mittels eines modifizierten Oligonukleotids)

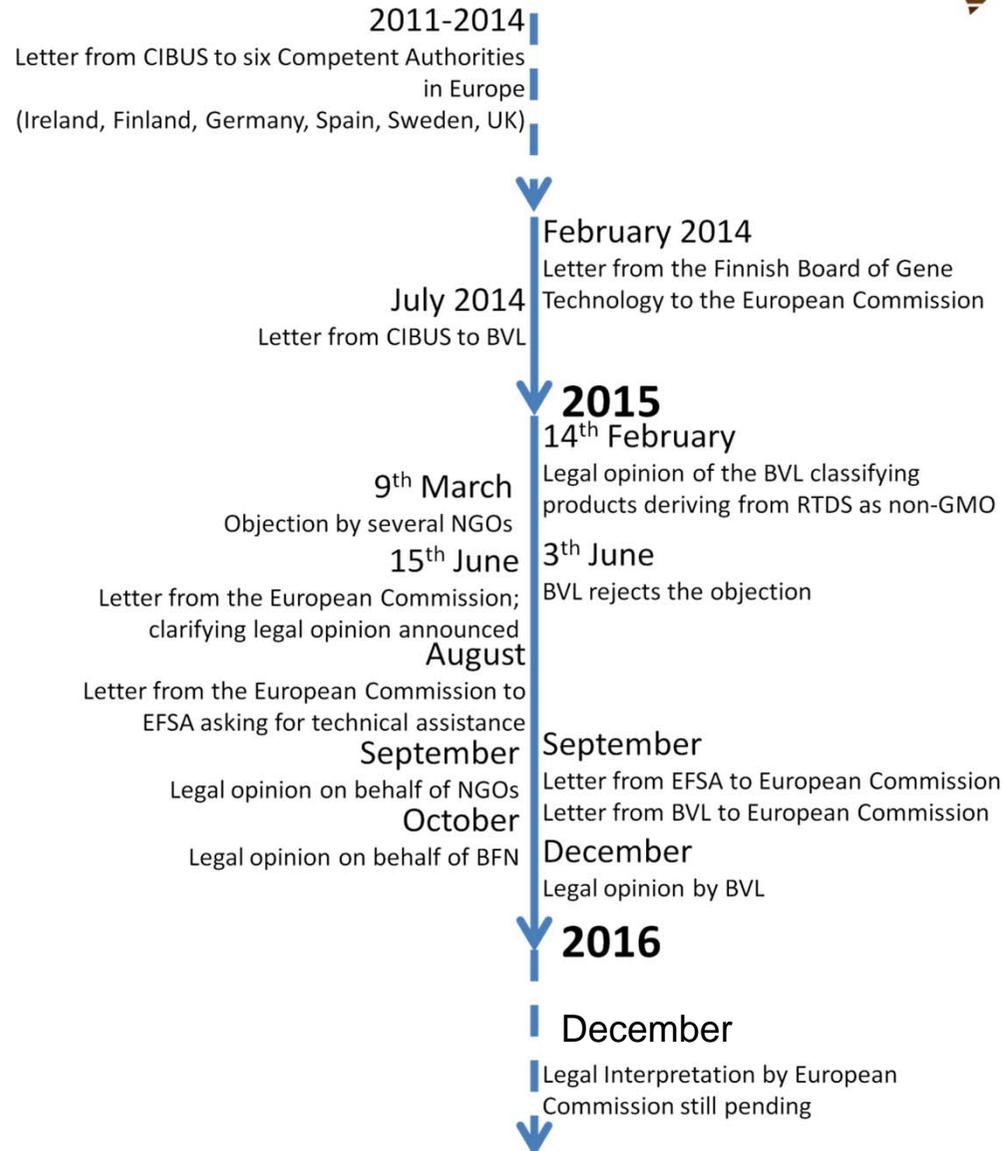


Nur kurze Veränderungen sind möglich (1-4 nt) - starker Patentschutz

# Debatte über die juristische Interpretation (1)



Zeitschiene der  
Debatte um die  
juristische  
Interpretation der  
Genome Editing  
Techniken und der  
damit erzeugten  
Pflanzen in der  
Europäischen Union



# Debatte über die juristische Interpretation (2)



**Table 1** Comparison of SDN-1, -2, and -3 in relation to the legal interpretations (BVL, NGOs, BFN, NTWG, ZKBS, EFSA)

	BVL <sup>1</sup>	ZKBS <sup>2</sup>	NTWG <sup>3</sup>	EFSA <sup>4,5</sup>	NGOs <sup>6</sup>	BFN <sup>7</sup>
SDN-1	Non GMO	Non GMO	Non GMO	Non GMO	GMO	GMO
SDN-2	Non GMO	Non GMO	Non GMO	Non GMO	GMO	GMO
SDN-3	GMO	GMO	GMO	GMO <sup>b</sup>	GMO	GMO
ODM	Non GMO <sup>a</sup>	Non GMO	Non GMO	Non GMO	GMO	GMO
RdDM	n.d	Non GMO	Non GMO	Non GMO	n.d	GMO
Interpretation	Process/product	n.d	n.d	n.d	Process	Process

The classification refers to plants generated by using these techniques without stable integration of recombinant DNA

*SDN* site-directed nucleases, *ODM* oligonucleotide-directed mutagenesis, *RdDM* RNA-dependent DNA methylation, *n.d* no opinion given, *GMO* genetically modified organism, *BVL* German Federal Agency for Consumer Protection and Food Safety, *ZKBS* Zentrale Kommission für biologische Sicherheit, *NTWG* New technology working group, *EFSA* European Food Safety Authority. 1 BVL 2015d, 2 ZKBS 2012, 3 Lusser et al. 2011, 4 EFSA 2012, 5 EFSA GMO unit 2015, 6 Krämer 2015, 7 Spranger 2015

<sup>a</sup> Serial steps should be considered separately

<sup>b</sup> Due to the known target site of the transgene lesser amounts of event-specific data might be necessary for the risk assessment

Sprink et al., 2016



## Debatte über die juristische Interpretation (3)



BVL (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit)  
Opinion on the legal classification of New Plant Breeding Techniques, in particular ODM and CRISPR-Cas9

[http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06\\_Gentechnik/Opinion\\_on\\_the\\_legal\\_classification\\_of\\_New\\_Plant\\_Breeding\\_Techniques.pdf;jsessionid=9A8AE3A96D9EDD1DA8D39B19544B34A9.2\\_cid322?\\_\\_blob=publicationFile&v=3](http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/Opinion_on_the_legal_classification_of_New_Plant_Breeding_Techniques.pdf;jsessionid=9A8AE3A96D9EDD1DA8D39B19544B34A9.2_cid322?__blob=publicationFile&v=3)

VIB (Vlaams Instituut voor Biotechnologie)

When is an organism subject to the provisions of the EU GMO legislation? An in-depth analysis

[http://www.vib.be/en/about-vib/organization/Documents/rc\\_bvl\\_2016\\_00533%20GMO%20definition%20legal%20analysis\\_final.pdf](http://www.vib.be/en/about-vib/organization/Documents/rc_bvl_2016_00533%20GMO%20definition%20legal%20analysis_final.pdf)

## Open letter to the Commission on new genetic engineering methods

27 January 2015

### **We call on the Commission to reject any attempt to exclude these new techniques from EU regulation.**

In particular, we urge the Commission to ensure that:

- ❖ Organisms produced by these new techniques will be regulated as genetically modified organisms under existing EU regulations (Directive 2001/18). This means that they will require a full risk assessment before any approval or authorisation is given.
- ❖ Any food, feed and seeds as well as other breeding material produced using such new techniques will be labelled and fully traceable throughout the food and feed supply chain.
- ❖ Nothing in the TTIP and CETA negotiations will limit Europe's sovereignty and ability to regulate new genetic engineering methods and products as GMOs.
- ❖ Current GM health and environmental safety testing requirements are strengthened in light of the enhanced ability of these new techniques - individually or in combination - to alter the genetic code of plants, animals and other organisms.

Juncker's SOTEU speech

## **State of the Union Address 2016: Towards a better Europe - a Europe that protects, empowers and defends**

Strasbourg, 14 September 2016

[http://europa.eu/rapid/press-release\\_SPEECH-16-3043\\_en.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_SPEECH-16-3043_en.htm)

### **A EUROPE THAT TAKES RESPONSIBILITY**

... I call on all EU institutions and on all of our Member States to take responsibility.

We have to stop with the same old story that success is national, and failure European. Or our common project will not survive. ...

We also have to take responsibility in recognising when some decisions are not for us to take. It is not right that when EU countries cannot decide among themselves whether or not to ban the use of **glyphosate in herbicides**, the Commission is forced by Parliament and Council to take a decision.

So we will change those rules – because that is not democracy.

The Commission has to take responsibility by being political, and not technocratic.

**A political Commission** is one that listens to the European Parliament, listens to all Member States, and listens to the people. ...

### **Französische Anrufung des EuGH**

Das oberste französische Verwaltungsgericht (Conseil d'Etat) hat am 3. Oktober 2016 ein Vorabentscheidungsersuchen an den EuGH gerichtet. Darin geht es insbesondere um die Auslegung des Begriffs der Mutagenese im Sinne der Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG und die Anwendbarkeit des Gentechnikrechts auf bestimmte Neue Züchtungstechnologien.

Übliche Dauer von Vorabentscheidungsverfahren vor dem EuGH: diesbezügliche Entscheidung voraussichtlich nicht vor 2018

## Wer fasst die heißen Kartoffeln an?

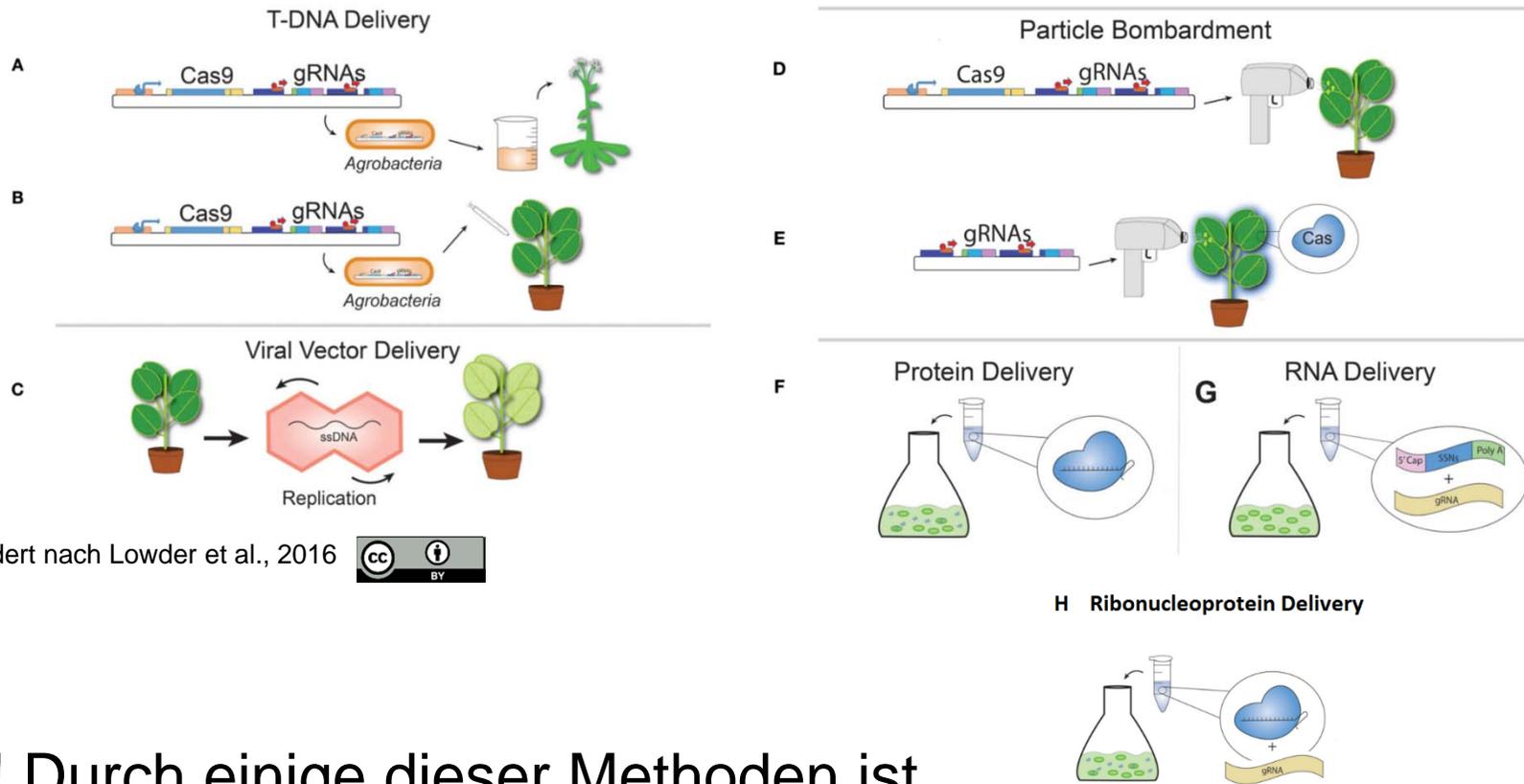


Die Europäische Kommission hat beschlossen, den Mechanismus für wissenschaftliche Beratung (SAM) um eine aktuelle wissenschaftliche Erläuterung zu den neuen Techniken der Pflanzen- und Tierzucht und bestimmten Anwendungen der Lebensmittelerzeugung zu bitten. Der Mechanismus wurde unlängst eingerichtet, um die Kommission zeitnah mit hochwertiger, unabhängiger wissenschaftlicher Expertise zu versorgen.

### **Request to SAM HLG**

SAM HLG is asked in the first instance and by March 2017 to provide an explanatory note on *new techniques in agricultural biotechnology including their potential agricultural application in synthetic biology and for gene drive, taking into consideration the most recent developments in the agricultural sector.*

# Funktioniert Genome Editing (CRISPR/Cas9) auch ohne den Einbau von Fremdgenen ins Genom?



Geändert nach Lowder et al., 2016 

Ja! Durch einige dieser Methoden ist eine Veränderung des Genoms ohne den Einbau von Fremdgenen möglich!

Landesverwaltungsamt  
Referat Immissionsschutz, Chemikaliensicherheit,  
Gentechnik, Umweltverträglichkeitsprüfung

17.02.2016

## **Einstufung von Arbeiten zur sequenzspezifischen Mutationsinduktion bei Pflanzen ohne die Verwendung rekombinanter DNA**

... im Julius Kühn-Institut, Institut für die Sicherheit biotechnologischer Verfahren bei Pflanzen, sollen in Zukunft Forschungsarbeiten durchgeführt werden, bei denen ohne den Einsatz von rekombinanter DNA sequenzspezifisch Mutationen bei Pflanzen erzeugt werden. Unter Einsatz von rekombinant hergestelltem und aufgereinigtem Cas9-Protein (durch entsprechende Reinigungstechniken frei von DNA) zusammen mit den entsprechenden guide-RNA-Molekülen sollen einzelne Mutationen in das Genom von *Arabidopsis thaliana* eingeführt werden, die auch auf natürliche Art und Weise bzw. analog zur physikalischen oder chemischen Mutagenese entstehen könnten.

## Pläne mit CRISPR/Cas9 im JKI-Institut SB (2)



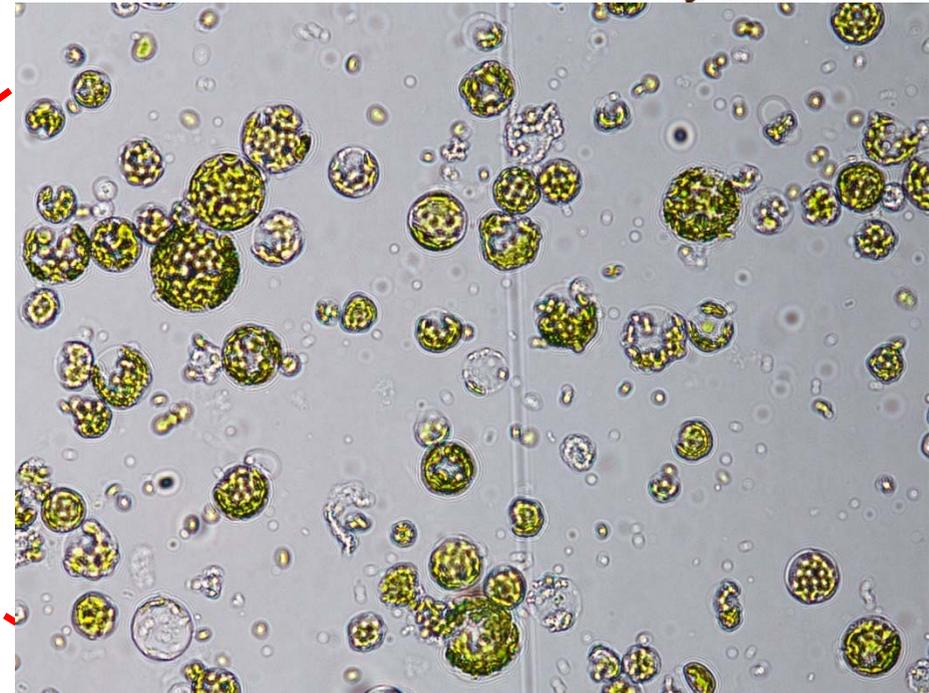
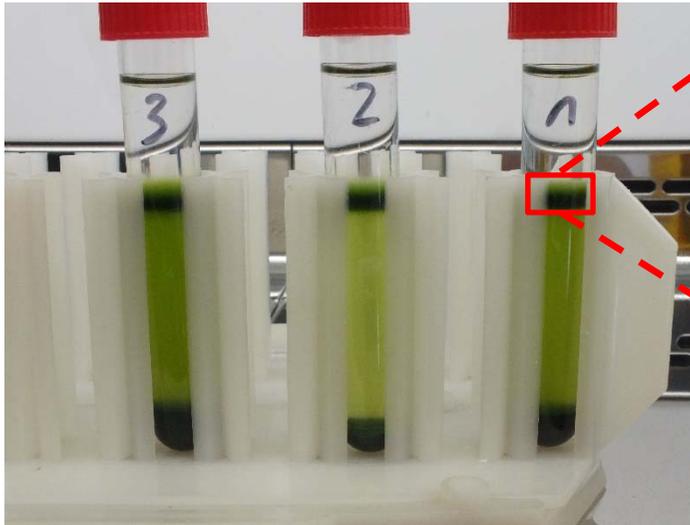
Durch Polyethylenglykol (PEG) vermittelte Fusion von Arabidopsis-Protoplasten und Vesikeln, die Cas9-Protein und isolierte guide-RNA enthalten, sollen die Mutationen erzeugt werden. Da RNA als alleinige Nukleinsäure für die Induktion der Mutationen genutzt werden soll, wird keine rekombinante DNA in die Protoplasten und das Pflanzengenom eingebracht. Sowohl die eingesetzten RNAs als auch das Cas9-Protein werden innerhalb kurzer Zeit von den Zell-eigenen Proteasen abgebaut. Die daraus mittels Gewebekultur regenerierten Pflanzen sind daher frei von rekombinanten Nukleinsäuren. Die Arbeiten sollen im Labor und Gewächshaus stattfinden.

...

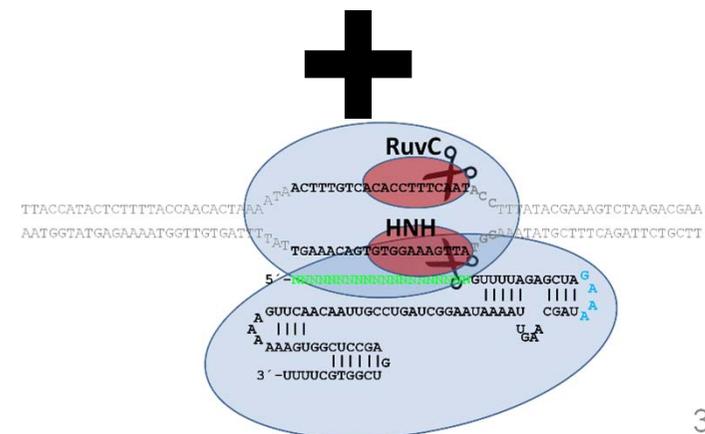
Entsprechend unserer Bewertung handelt es sich hierbei nicht um gentechnische Arbeiten gemäß GenTG und bei den resultierenden Organismen gemäß § 3 Nr. 3a. Buchst. b GenTG nicht um gentechnisch veränderte Organismen.

Ich bitte Sie um zeitnahe Mitteilung, ob Sie unsere Einschätzung teilen, damit wir die entsprechenden Arbeiten außerhalb des GenTG-Regelungsbereiches durchführen können.

# Pläne mit CRISPR/Cas9 im JKI-Institut SB (3)



Arabidopsis thaliana, Möhre und weitere  
Anwendungen und Sicherheitsforschung  
(Off-Target- Analysen)



### **Umeå researcher served a world first (?) CRISPR meal**

[2016-09-05] For (probably) the first time ever, plants modified with the “genetic scissors” CRISPR-Cas9 has been cultivated, harvested and cooked. Stefan Jansson, professor in Plant Cell and Molecular Biology at Umeå University, served pasta with “CRISPRy” vegetable fry to a radio reporter. Although the meal only fed two people, it was still the first step towards a future where science can better provide farmers and consumers across the world with healthy, beautiful and hardy plants.

<http://www.teknat.umu.se/english/about-the-faculty/news/newsdetailpage/umea-researcher-served-a-world-first-crispr-meal.cid272955>

*Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit*

