

SONDERHEFT
2024

VBio

Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**MATERIAL-
FORSCHUNG**
Gesteinsbesiedelnde
Pilze

PFLANZENGENETIK
Genomsequenzen
sichtbar machen

EXPERIMENT
Pauline und die
Ausreißer

BIOLOGIE

IN UNSERER ZEIT

CRISPR-Cas

... mehr als nur
Verteidigung

Gentechnik und neue genomische Techniken in der Pflanzenzüchtung

CRISPR-Cas für eine nachhaltigere Zukunft der Landwirtschaft

FABIENNE GEHRKE | NIKLAS CAPDEVILLE | LAURA MERKER | HOLGER PUCHTA



Der rapide Klimawandel stellt die gegenwärtige Landwirtschaft vor die enorme Herausforderung, schnell genug massive Ertragsverluste zu kompensieren und gleichzeitig den steigenden Bedarf der stetig wachsenden Bevölkerung sicherzustellen. Für eine zukunftsfähige nachhaltige Landwirtschaft werden daher innovative Handlungsstrategien benötigt. Großes Potenzial bietet dabei die biotechnologische Anwendung des CRISPR-Cas-Systems, da nicht nur einzelne Gene gezielt editiert, sondern auch deren Rekombination beeinflusst werden kann, wodurch eine effektive Anpassung von Nutzpflanzen im Einklang mit einer biodiversen und nachhaltigen Landwirtschaft ermöglicht wird.

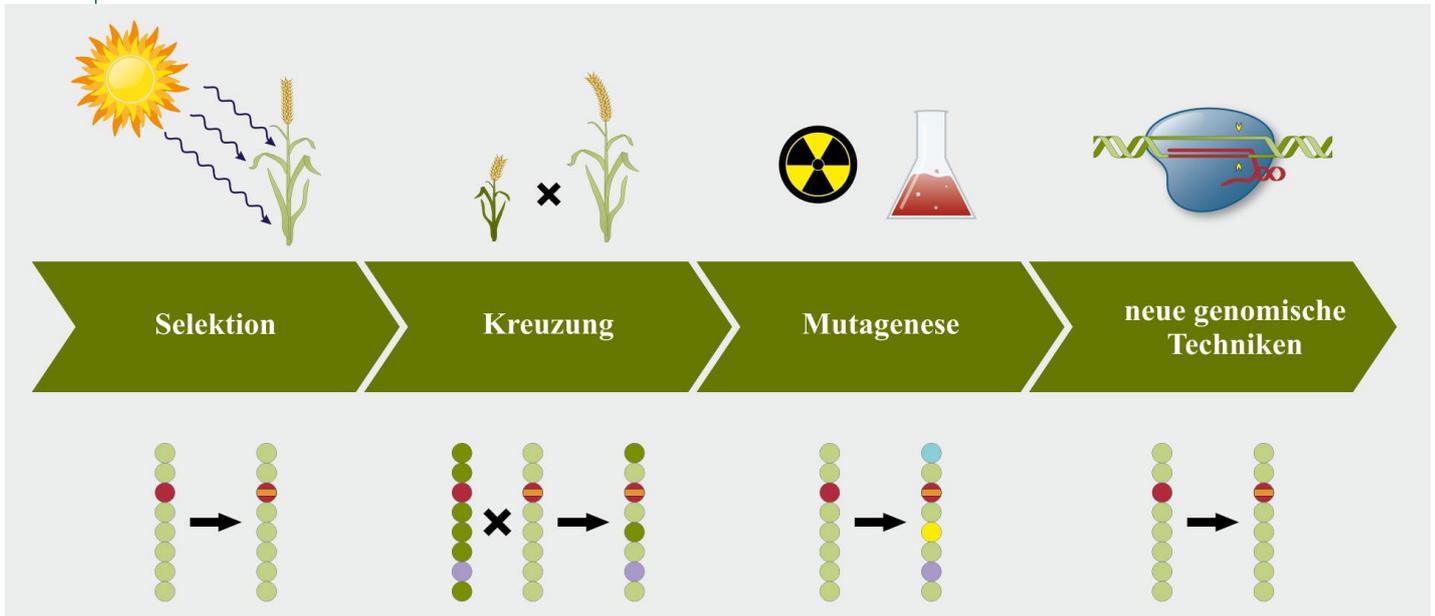
Dringend benötigte Resistenzen gegen Schadpilze könnten über CRISPR-Cas in Bananenpflanzen eingefügt werden.

Foto: PublicDomainPictures über www.pixabay.com.

Seit der Entstehung des Lebens ist der genetische Code Veränderungen unterworfen, welche auf die endogene fehleranfällige Reparatur natürlich vorkommender DNA-Schäden zurückgehen und sich in Substitutionen, Insertionen und Deletionen manifestieren. Solche Mutationen führen auch innerhalb einer einzigen Spezies zur Entstehung eines breiten genetischen Spektrums, wobei die Auswirkungen auf den Organismus von der Position der Veränderungen im Genom abhängig sind. So können Mutationen in kodierenden Bereichen zu einem *knockout*

des entsprechenden Gens führen, während Veränderungen in regulatorischen Bereichen die Expression mehrerer Gene beeinflussen können. Insgesamt resultiert jedoch lediglich etwa nur ein Prozent der natürlichen Mutationen in einer neuen Eigenschaft, welche unter entsprechendem Selektionsdruck in einer Spezies etabliert wird. Auf diese Weise prägen spontane Mutationen und der Selektionsdruck die Evolution aller Lebewesen und ermöglichen eine Anpassung an sich wandelnde Umweltbedingungen. Jahrtausendlang wurde das Auftreten spontaner

ABB. 1 | GESCHICHTE DER PFLANZENZÜCHTUNG



Jahrtausendlang beruhte die Pflanzenzucht auf der Selektion von Pflanzen, welche durch spontane Mutationen agronomisch wertvolle Eigenschaften aufwiesen. Später beschleunigten die gezielte Kreuzungszüchtung sowie die ungerichtete Mutagenese mit chemischen oder physikalischen Agenzien diesen Prozess, wobei jedoch häufig unerwünschte Veränderungen im Genom auftreten. Neue genomische Techniken (NGT) wie das CRISPR-Cas-System ermöglichen dagegen die sequenzspezifische Induktion einzelner Modifikationen.

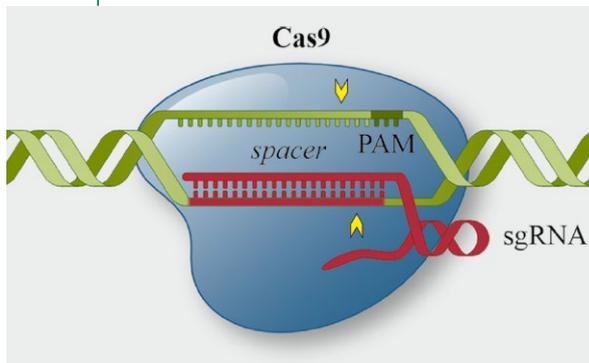
Mutationen auch zur Züchtung von Kulturpflanzen genutzt, wobei die natürliche Selektion durch die anthropogene Vermehrung von Pflanzen mit agronomisch wertvollen Eigenschaften ersetzt wurde. Später ermöglichte das Verständnis der Vererbungsgesetzmäßigkeiten eine gezielte Kreuzungs- und Hybridzüchtung, um so gewünschte Eigenschaften verschiedener Kultivare neu zu kombinieren (Abbildung 1). Da bei der zugrunde liegenden zufälligen Rekombination jedoch häufig auch agronomisch nachteilige Gene eingebracht werden, sind meist zeitaufwändige Rückkreuzungsschritte für die Etablierung des gewünschten Phänotyps notwendig. Zwar konnte auf der Grundlage dieser Züchtungsstrategien eine große Sortenvielfalt etabliert werden, jedoch ist die genetische Vielfalt heutiger Kulturpflanzen durch den vom Menschen vorgegebenen Selektionsdruck stark verarmt, so dass die Züchtung neuer leistungsfähigerer Sorten anhand dieser klassischen Methoden nur noch sehr eingeschränkt möglich ist. Um eine große Anzahl zufälliger Mutationen zu induzieren und so die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten erwünschter Eigenschaften zu erhöhen, wurde daher Anfang des 20. Jahrhunderts das Prinzip der Mutagenesezüchtung entwickelt, im Rahmen derer Pflanzen mit chemischen oder physikalischen Mutagenen behandelt werden (Abbildung 1). Heute gehen fast alle gängigen Hartweizensorten, aber auch viele andere Getreide-, Reis-, Obst-, Gemüsesorten und Hülsenfrüchte auf diese Form der Züchtung zurück. Allerdings erfordert die ungerichtete Induktion von Mutationen im gesamten Genom ebenfalls langwierige Rückkreuzungen, um unerwünschte Verände-

rungen zu kompensieren. In den 1990er Jahren wurde schließlich eine gezielte Mutagenese durch die Adaptierung natürlich vorkommender sequenzspezifischer Nukleasen ermöglicht, welche Doppelstrangbrüche (DSB) in der DNA induzieren und so die Entstehung von Mutationen allein an dieser Stelle fördern. Dabei beruht auch

IN KÜRZE

- Durch jahrtausendelange Selektionszüchtung ist die **genetische Vielfalt unserer Kultursorten stark verarmt**, was eine Anpassung an sich rapide ändernde klimatische und demographische Bedingungen durch konventionelle Züchtungsmethoden zunehmend erschwert.
- Für eine zukunftsfähige, nachhaltige Landwirtschaft sind innovative Handlungsstrategien erforderlich, wobei besonders die **biotechnologische Anwendung des CRISPR-Cas-Systems** großes Potenzial bietet.
- Um die Folgen des anthropogenen Klimawandels zu kompensieren, kann die Anwendung des CRISPR-Cas-Systems die **kostengünstige Züchtung von widerstandsfähigen Pflanzenarten** ermöglichen. Somit könnte die individuelle Anpassung weltweit verbreiteter Kultursorten an unterschiedliche abiotische Faktoren wie Salz- und Trockenstress innerhalb kürzester Zeit gestattet werden.
- Angesichts des kontinuierlichen Bevölkerungswachstums und der gleichzeitig sinkenden Verfügbarkeit von Anbauflächen spielen CRISPR-Cas-basierte Strategien zur **Optimierung der Fruchtmenge oder der Lagerfähigkeit** eine entscheidende Rolle.
- Zudem kann der **Einsatz von Düngemitteln und Pestiziden reduziert** werden, indem ohne Eingriff in die Biodiversität die Vermittlung von Resistenzen oder die Optimierung der Nährstoffaufnahme erzielt wird.
- Es bleibt jedoch abzuwarten, ob die **rechtlichen Rahmenbedingungen und die Kundenakzeptanz** das Potenzial der biotechnologischen Anwendung des CRISPR-Cas-Systems in der Landwirtschaft erkennen und eine nachhaltige Bewältigung künftiger Herausforderungen ermöglichen.

ABB. 2 | DAS CRISPR-CAS9-SYSTEM



Das CRISPR-Cas9-System setzt sich aus einer RNA- und einer Proteinkomponente zusammen. Während die *single guide-RNA (sgRNA)* durch einen zur Zielsequenz komplementären Bereich (*spacer-Sequenz*) die Sequenzspezifität vermittelt, induziert die Cas9-Nuklease den DNA-Doppelstrangbruch. Zur Differenzierung zwischen Eigen- und Fremd-DNA ist zusätzlich ein spezifisches, unmittelbar an die Zielsequenz angrenzendes Sequenzmotiv (*protospacer adjacent motif, PAM*) erforderlich.

diese sequenzspezifische Mutagenese auf der endogenen fehleranfälligen Reparatur der induzierten DSB. Während der Einsatz der ersten sequenzspezifischen Nukleasen allerdings noch einen hohen Zeit- und Kostenaufwand erforderte, revolutionierte die Adaptierung des CRISPR-Cas-Systems Anfang der 2010er Jahre den Bereich der gezielten Mutagenese aufgrund der einfachen und kostengünstigen Anwendung (Abbildung 1). Dieses ursprünglich aus Prokaryoten stammende, adaptive Immunsystem gegen pathogene Nukleinsäuren setzt sich dabei aus zwei Komponenten zusammen: Einem RNA-Anteil, welcher die Zielstelle im Genom definiert, sowie einer Proteinkomponente, welche die Induktion des DSB katalysiert. Dabei besitzt die CRISPR-RNA (crRNA) einen zur Zielsequenz komplementären Bereich, die *spacer-Sequenz*, welche die Sequenzspezifität vermittelt und durch simplen Austausch das Adressieren neuer Zielstellen ermöglicht (Abbildung 2). In Verbindung mit einer Cas-Nuklease oder einem Cas-Nukleasekomplex kann so nahezu in jeder Sequenz gezielt ein DSB induziert werden, wobei die meisten Cas-Nukleasen zusätzlich ein spezifisches, unmittelbar an die Zielsequenz angrenzendes Sequenzmotiv (*protospacer adjacent motif, PAM*) zur Differenzierung zwischen Eigen- und Fremd-DNA erfordern.

Das biotechnologische Werkzeug CRISPR-Cas

Der simple modulare Aufbau der CRISPR-Cas-Systeme ermöglicht die schnelle und einfache Adaptierung für eine gezielte Genomeditoring. Dabei steht eine Vielzahl an CRISPR-Cas-Systemen zur Verfügung, welche sich durch den selektiven Druck sich ständig ändernder Pathogene entwickelt haben und anhand ihrer Effektorproteine klassifiziert werden. Am weitesten für den biotechnologischen

Einsatz verbreitet ist das als erstes adaptierte und durch die Nuklease Cas9 gekennzeichnete System (Abbildung 2). Für die einfachere Anwendung in der Molekularbiologie wurde hierbei die von Cas9 zusätzlich benötigte *trans-activating crRNA (tracrRNA)* mit der crRNA zur *single guide-RNA (sgRNA)* verbunden [1]. Da sich der Einsatz von CRISPR-Cas9 aufgrund der Anforderungen an die PAM-Sequenz auf Guanosin-(G)-reiche Zielsequenzen beschränkt, spielen auch CRISPR-Cas-Systeme, welche durch das Effektorprotein Cas12a gekennzeichnet sind, eine entscheidende Rolle im molekularbiologischen Einsatz. Durch die Erkennung Thymidin-(T)-reicher PAM-Sequenzen ermöglicht diese Nuklease auch die gezielte DSB-Induktion in A/T-reichen Genombereichen wie Promotoren und Introns. Um die Vielfalt der möglichen Zielsequenzen noch zu erhöhen, wurde zudem eine Reihe von Cas9- und Cas12a-Varianten entwickelt, welche verschiedenste PAM-Sequenzen erkennen können. Aufgrund des steigenden Einsatzes viraler Vektoren, welche nur eine beschränkte Kapazität aufweisen, sind zudem insbesondere auch kleinere Nukleasen wie die des CRISPR-Cas12f- oder CRISPR-Cas12 π -Systems von Interesse für die Pflanzenzucht und -forschung.

Aufgrund ihrer natürlichen Vielfalt in Verbindung mit der einfachen molekularbiologischen Anwendung stellen CRISPR-Cas-Nukleasen ein effizientes Werkzeug für die Pflanzenzucht dar, wobei jedoch die Effizienz verschiedener Systeme organismusspezifisch stark variiert. Insbesondere die unterschiedlichen Temperaturanforderungen stellen beim Einsatz der bakteriellen CRISPR-Cas-Systeme in Pflanzen eine Herausforderung dar, da die optimale Temperatur für die meisten Cas-Nukleasen bei 37 °C liegt, während Pflanzen meist bei deutlich geringeren Temperaturen kultiviert werden. Daher wurden verschiedene, für den Einsatz in Pflanzen optimierte Cas9- und Cas12a-Varianten entwickelt, welche eine verbesserte Sequenzspezifität oder verbesserte Schnitteffizienzen auch bei niedrigeren Temperaturen aufweisen. Insbesondere Cas12a-Nukleasen weisen eine stark temperaturabhängige Effizienz auf, so dass Varianten mehrerer Orthologe wie *enhanced AsCas12a (enAsCas12a)*, *improved ErCas12a (imErCas12a)* oder *temperature tolerant LbCas12a (ttLbCas12a)* etabliert wurden. Letztere konnte dabei weiter durch die Integration von Introns in die kodierende Sequenz optimiert werden (ttLbCas12a-i) [2].

Während sich die CRISPR-Cas-vermittelte DSB-Induktion als wertvolles Instrument für die gezielte Steigerung der genetischen Variabilität erwiesen hat, beruhen viele agronomisch wichtigen Merkmale auf Allelen mit nur wenigen Basenänderungen, weshalb die Möglichkeit, gezielt vordefinierte Sequenzänderungen zu induzieren, für die Pflanzenzüchtung von besonderem Interesse ist. Für die Induktion solcher spezifischen Mutationen wurden daher verschiedene CRISPR-Cas-basierte Werkzeuge entwickelt (Abbildung 3). So basieren *base editors* auf der Fusion von Cas-Proteinen mit Deaminasen, wodurch die Substitution

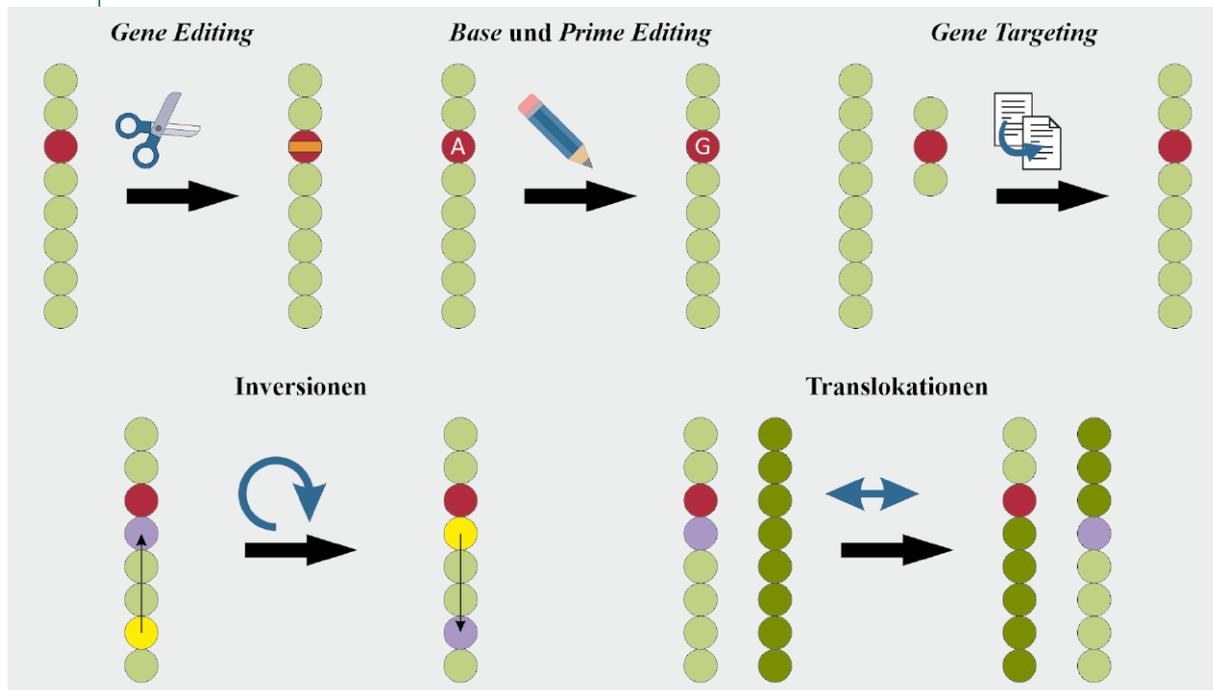
einzelner Basen ermöglicht wird. Größere Sequenzänderungen können durch den Einsatz von *prime editors* erzielt werden, wobei ein RNA-Molekül als Matrize für eine reverse Transkriptase dient, welche die Sequenz auf die Zielstelle des fusionierten Cas-Proteins überträgt [2]. Eine weitere Möglichkeit, welche auch die gezielte Integration ganzer Gene ermöglicht, stellt das auf dem DSB-Reparaturmechanismus der homologen Rekombination (HR) basierende *gene targeting* dar. Die HR spielt in somatischen Pflanzenzellen eine untergeordnete Rolle, ermöglicht aber eine fehlerfreie Reparatur, da sie auf der Verwendung von zur Bruchstelle homologen Sequenzen als Matrize beruht. Wird daher eine Donorsequenz zur Verfügung gestellt, welche die gewünschten Sequenzänderungen trägt, können diese präzise an der Zielstelle integriert werden [2].

Abgesehen von der Veränderung kodierender Sequenzen ist auch die Modifikation der Genexpression ein vielversprechender Ansatz für die Züchtung neuer Kultursorten, da die Ausprägung agronomisch wichtiger Merkmale in erster Linie von der koordinierten Expression einer Vielzahl unterschiedlicher Gene beeinflusst wird. So bietet die Modifikation der für Transkriptionsfaktoren kodierenden Sequenzen oder deren Bindestellen in regulatorischen Bereichen die Möglichkeit, die Expression nachgeschalteter Gene zu beeinflussen, ohne diese selbst zu verändern. Besonders interessant ist dabei auch die Verwendung von

katalytisch inaktivierten Cas-Nukleasen, welche zwar spezifisch an die Zielsequenz binden, jedoch keinen Bruch induzieren und so für die gerichtete Rekrutierung unterschiedlichster Effektoren genutzt werden können. Neben der Rekrutierung von Transkriptionsaktivatoren und -repressoren zur temporären Modulation individueller Genexpressionsmuster können durch die Rekrutierung chromatinmodulierender Enzyme auch vererbare, epigenetische Modifikationen induziert werden [3].

Ein weiterer großer Vorteil der CRISPR-Cas-Systeme ist deren besondere Eignung für die gleichzeitige Editierung mehrerer Zielsequenzen, wodurch simultan die genetische Variabilität in verschiedenen genomischen Loci gesteigert werden kann. Dies ermöglicht zudem, erwünschte Eigenschaften wilder Sorten mit agronomisch wertvollen Merkmalen zu kombinieren, indem mehrere Mutationen, welche in für den Ertrag wichtigen Genen domestizierter Pflanzen identifiziert wurden, in Wildpflanzen nachgebildet werden. Neben der Veränderung von Merkmalen ist insbesondere auch deren Rekombination die Grundlage für die Züchtung neuer Sorten, wobei genetische Kopplungen wesentliche Hindernisse darstellen, da die Wahrscheinlichkeit für eine zufällige Rekombination zweier Gene sinkt, je näher diese beieinander liegen. Eine weitere Limitierung stellen chromosomale Umstrukturierungen dar, wobei insbesondere Inversionen die Anlagerung homologer Sequen-

ABB. 3 | BIOTECHNOLOGISCHE ANWENDUNGEN DES CRISPR-CAS-SYSTEMS



Durch die sequenzspezifische Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB), welche durch die endogene, fehleranfällige Reparatur in spontanen Mutationen resultieren, können einzelne Gene gezielt editiert werden. Dagegen sind durch *base* und *prime editors* auch vordefinierte Sequenzänderungen möglich. Größere Modifikationen können im Rahmen des *gene targeting* durch das Einbringen einer Reparaturmatrize erzielt werden. Werden simultan zwei DSB erzeugt, können zudem Inversionen und Translokationen induziert werden, welche das Aufbrechen oder Erzeugen genetischer Kopplungsgruppen ermöglichen.

zen während der Meiose verhindern und eine Rekombination innerhalb des invertierten Bereiches reprimieren können. Dabei kann infolgedessen sogar eine reproduktive Isolation zweier Kultivare eintreten.

Um solche Genomstruktur-bedingten Einschränkungen bei der Züchtung neuer Hochleistungssorten zu umgehen, stellt die gezielte CRISPR-Cas-vermittelte Induktion chromosomaler Umstrukturierungen einen vielversprechenden Lösungsansatz dar. Dabei ermöglicht die Induktion von zwei DSB auf verschiedenen Chromosomen, gezielt gekoppelte Gene zu trennen oder neue Kopplungsgruppen zu erzeugen, indem die reziproke Translokation der Chromosomenenden begünstigt wird. Zudem kann durch die Induktion zweier DSB auf demselben Chromosom die Inversion des flankierten Bereichs erzielt werden und so die meiotische Rekombination in diesem Abschnitt beeinflusst werden, wobei sogar nahezu ganze Chromosomen ausgeschlossen werden können. Somit ermöglicht der Einsatz des CRISPR-Cas-Systems nicht nur die gezielte Induktion von Mutationen, sondern auch die Beschleunigung der Züchtung neuer Sorten, ohne die Sequenz der genetischen Information zu verändern (Abbildung 3) [4, 5].

Von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche CRISPR-Cas-vermittelte Genomeditierung ist neben der Identifikation einer geeigneten Zielsequenz das effiziente Einbringen der entsprechenden Komponenten in die Pflanzenzellen. Eine der geläufigsten Methoden ist dabei die Agrobakterien-vermittelte Transformation, im Zuge derer sich die natürliche Eigenschaft des Bakteriums *Agrobacterium tumefaciens* zunutze gemacht wird, pflanzliche Zellen zu infizieren und die eigene DNA in deren Genom zu integrieren. So können Gene, welche für eine Cas-Nuklease und die entsprechende crRNA kodieren, stabil in das Pflanzengenom eingebracht werden. Durch anschließende Rückkreuzungsschritte können Pflanzen gewonnen werden, welche die induzierte Mutation tragen, jedoch keine artfremden Gene. Im Gegensatz zur stabilen Transformation umgeht eine transiente Transformation die Notwendigkeit solcher Rückkreuzungsschritte durch eine temporäre Expression von Genen oder das Einbringen von Ribonukleoproteinkomplexen, ohne dass eingeführte DNA dauerhaft im Genom verbleibt. Dies resultiert somit ebenfalls in transgenfreien Pflanzen, die nicht von einer Pflanze zu unterscheiden sind, welche dieselbe Mutation natürlicherweise erworben hat [6].

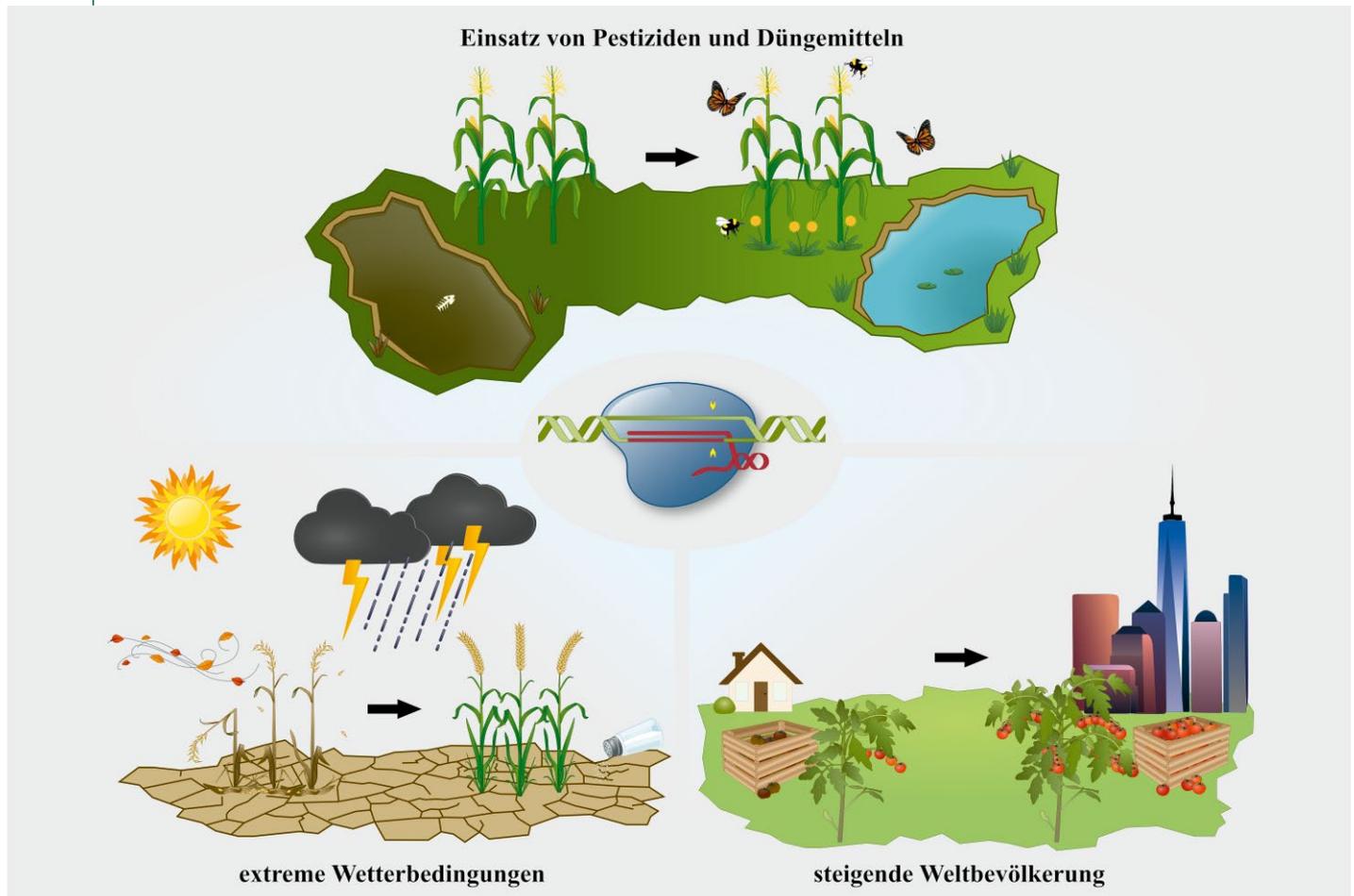
Potenzial des CRISPR-Cas-Systems für eine nachhaltige Landwirtschaft

Durch anthropogene Aktivitäten wird zunehmend mehr in das Klimasystem der Erde eingegriffen und infolgedessen eine Vielzahl von klimatischen Variablen beeinflusst, wodurch es zu weitreichenden Auswirkungen auf die Umwelt, die Ökosysteme und damit auf die menschliche Gesellschaft kommt. Deutlich wird dies unter anderem durch verstärkte Wetterereignisse, den steigenden Meeresspiegel sowie Veränderungen in der Landnutzung und der

landwirtschaftlichen Produktion. Neben der Bekämpfung der Ursachen gilt es ebenso, bereits aktuelle Auswirkungen angemessen zu bewältigen. Gerade in der Landwirtschaft bestehen vielversprechende Möglichkeiten, die Nahrungsmittelproduktion an die gegebenen Umweltbedingungen anzupassen und eine zukunftsfähige Versorgung der Weltbevölkerung sicherzustellen. Dabei weist insbesondere die Anwendung des CRISPR-Cas-Systems ein erhebliches Potenzial auf, Pflanzen effizient an die künftigen Herausforderungen des anthropogenen Klimawandels anzupassen und zu einer nachhaltigeren Landwirtschaft beizutragen (Abbildung 4).

Herausforderung: Extreme Wetterbedingungen

Der agronomische Einsatz des CRISPR-Cas-Systems als biotechnologisches Werkzeug ermöglicht eine kostengünstige Züchtung von widerstandsfähigen Pflanzenarten und gestattet die individuelle Anpassung weltweit verbreiteter Kultursorten an unterschiedliche abiotische Faktoren innerhalb kürzester Zeit (Abbildung 4). Besonders im Fokus steht dabei die Adaptierung an Stressoren wie extreme Temperaturen, Dürre und Salinität, welche für erhebliche Ernteverluste um schätzungsweise bis zu 70 Prozent in der landwirtschaftlichen Produktion verantwortlich sind [7]. Dies würde nicht nur einen vielversprechenden Ansatz zur Steigerung der Ernteerträge für die Bewältigung der global zunehmenden Lebensmittelnachfrage darstellen, sondern zugleich die Weiterverwendung von bestehenden, suboptimalen Anbauflächen ermöglichen und somit eine weitere Entwaldung verhindern. Da pflanzliche Entwicklungsprozesse maßgeblich von den klimatischen Bedingungen beeinflusst und gesteuert werden, können bereits geringe Temperaturabweichungen negative Auswirkungen auf die Pflanzenphysiologie haben. Dabei wird die Funktionalität verschiedener Enzyme, Phytohormone und anderer Signalmoleküle durch Temperaturstress beeinflusst, was sich wiederum negativ auf die Blattphotosynthese, Biomasseakkumulation und den Ertrag auswirkt. Analog zu bereits erfolgreich durchgeführten Geneditierungsstrategien in Reis, Baumwolle sowie in unterschiedlichen Gemüsesorten könnte dabei die CRISPR-Cas9-basierte Modifikation thermosensibler Signalkaskaden die Toleranz gegenüber Temperaturstress erhöhen. So konnte beispielsweise bereits in Tomaten, welche üblicherweise bei 25 °C kultiviert werden, durch die CRISPR-Cas9-vermittelte Editierung des *HyPRP1*-Gens, einem negativen Regulator der Hitzestressreaktion, die Toleranz gegenüber hohen Temperaturen von bis zu 45 °C erzielt werden [8]. Neben der Modifikation von Thermosensorproteinen und Signalkaskaden kann zudem eine Modifikation der Pflanzenmorphologie die Anpassung an Wetterextreme und die daraus resultierenden sekundären Folgen unterstützen. So gehen mit erhöhten Temperaturen trockene Böden einher, welche die pflanzliche Wasserverfügbarkeit maßgeblich einschränken. Während bereits an Dürre- oder Hitzeperioden ange-

ABB. 4 | POTENZIAL DES CRISPR-CAS-SYSTEMS FÜR EINE NACHHALTIGE LANDWIRTSCHAFT


Der anthropogene Klimawandel fordert die Landwirtschaft heraus, simultan massive Ertragsverluste auszugleichen und den steigenden Bedarf der wachsenden Bevölkerung zu decken. Für eine zukunftsfähige nachhaltige Landwirtschaft bietet die biotechnologische Anwendung des CRISPR-Cas-Systems großes Potenzial. Dabei kann der Einsatz von Düngemitteln und Pestiziden reduziert werden, wobei die Vermittlung von Resistenzen oder die Optimierung der Nährstoffaufnahme ohne Eingriff in die Biodiversität erzielt werden kann. Zusätzlich ist die kostengünstige Züchtung von widerstandsfähigen Pflanzenarten möglich und gestattet die individuelle Anpassung weltweit verbreiteter Kultursorten an unterschiedliche abiotische Faktoren innerhalb kürzester Zeit. Weiterhin spielen Strategien zur Beeinflussung der Fruchtmenge oder der Lagerfähigkeit angesichts des kontinuierlichen Bevölkerungswachstums und der gleichzeitig sinkenden Verfügbarkeit von Anbauflächen eine entscheidende Rolle für eine nachhaltige Landwirtschaft.

passte Pflanzenarten in ihren Organen Wasser speichern können, führt das intensivierete Wurzelwachstum zum Erreichen von tieferen Bodenschichten oder die vermehrte Schließung von Stomata unzureichend angepasster Pflanzen oftmals zu einer reduzierten Stoffwechselleistung und infolgedessen zu einem gehemmten Wachstumsverhalten und verminderten Ernteertrag. Um dem entgegenzuwirken, wurde kürzlich ein CRISPR-Cas9-vermittelter Geneditierungsansatz in *Vitis vinifera* (Weinrebe) zur Manipulation der Stomatadichte verfolgt, welcher eine Anpassung der Weinrebe an künftig trockenere Umweltbedingungen ermöglichte. Dabei konnte durch den *knockout* des *VvEPFL9*-Gens die Spaltöffnungsdichte im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert und somit die intrinsische Wassernutzungseffizienz der editierten Linien verbessert werden [9].

Nicht nur Temperaturen werden durch die globale Erderwärmung extremer werden, sondern auch das Niederschlagsverhalten, welches sich in Form von Stürmen und Starkregen negativ auf Erträge auswirken kann. Durch starke Unwetter werden nicht nur die für das pflanzliche Wachstum benötigten Nährstoffe aus dem Boden ausgewaschen, sondern auch physische Schäden an den Pflanzen verursacht. Um die Angriffsfläche von Pflanzen gegen extreme Winde und Unwetter zu minimieren und widerstandsfähige Kultursorten zu erzeugen, wurden bereits verschiedenste Züchtungsstrategien verfolgt. So konnte beispielsweise mithilfe eines CRISPR-Cas-basierten Geneditierungsansatzes eine kurzhalbige Maissorte erzeugt werden, welche eine bis zu 40 Prozent geringere Wuchshöhe als herkömmlicher Mais aufweist und einen besseren Schutz gegen Ernteverluste bietet [10].

Die Versalzung von Böden ist ein weiteres globales Problem in der Landwirtschaft, das sich auf über 400 Millionen Hektar weltweit erstreckt und direkte Auswirkungen auf die Ernteerträge und die Ernährungssicherheit hat. Als Ursachen der zunehmend erhöhten Bodensalinität werden oftmals die übermäßige Düngung und Bewässerung von Anbaugebieten sowie die Umwandlung natürlicher Lebensräume in landwirtschaftliche Flächen angeführt. Angepasst durch jahrtausendelange Evolutionsprozesse können einige Pflanzenarten osmoprotektive Metaboliten synthetisieren oder besitzen spezifische Mechanismen zur Ausscheidung von Salzionen durch spezialisierte Strukturen. Um auch Nutzpflanzen ohne solche Mechanismen an die erhöhten Salzkonzentrationen zu adaptieren, wurde auf der Grundlage des CRISPR-Cas-Systems bereits eine Vielzahl erfolgversprechender Ergebnisse durch die Manipulation von Signalkaskaden erzielt. So konnte beispielsweise in Soja durch den CRISPR-Cas9-vermittelten *knockout* des Peroxidase-regulierenden Faktors E2 eine Salztoleranz erzielt werden, da mit dessen Verlust die Anhäufung reaktiver Sauerstoffspezies während der Reaktion auf Salzstress vermindert wurde. Neben der erhöhten Salztoleranz wiesen die editierten Pflanzen zudem eine verkürzte Blüte- und Reifezeit auf, wodurch die E2-Geneditierung ein ideales Ziel für die molekulare Züchtung früh reifender und salztoleranter Sojasorten darstellt [11].

Herausforderung: Kontinuierlich steigende Weltbevölkerung

Angesichts des kontinuierlichen Bevölkerungswachstums und der gleichzeitig sinkenden Verfügbarkeit von Anbauflächen spielen ertragsoptimierende Strategien eine entscheidende Rolle für eine nachhaltige Landwirtschaft (Abbildung 4). Durch die Anwendung des CRISPR-Cas-Systems stehen verschiedene Lösungsansätze für die Beeinflussung agronomisch wichtiger Faktoren wie die Pflanzenstatur oder die Fruchtmenge zur Verfügung. Als häufiges Beispiel in diesem Kontext wird die Kurzhalmigkeit bei verschiedensten Kulturpflanzen, insbesondere bei Getreidearten wie Weizen, Reis, Gerste und Hafer genannt. Während lange Halme in der Wildnis die Vermehrung durch schnelles Abbrechen und Freisetzen des Saatguts fördern, werden in der Landwirtschaft bevorzugt kurzhalmige Kultursorten angebaut, um Ertragsverluste durch Windbruch, mechanische Ernte oder Lagerung zu vermeiden. Unter den zahlreichen Faktoren, die sich auf den Ertrag auswirken, stellt die Beeinflussung der Cytokinin-Homöostase einen praktikablen Weg zur Steigerung des Getreideertrags dar. So verbesserte die C-terminale Editierung des Cytokinin aktivierenden Enzyms OsLOGL5 den Kornertrag in Reis unter verschiedenen Umweltbedingungen [12]. Neben der Optimierung bereits etablierter Kultursorten ist auch die Adaptierung von Wildpflanzen mit wünschenswerten Eigenschaften zu neuen Nutzpflanzen möglich. Eine solche *de novo*-Domestizierung von

Wildpflanzen konnte bereits innerhalb von nur einer Generation in der wilden Tomatensorte *Solanum pimpinellifolium* erzielt werden, indem CRISPR-Cas9-vermittelt sechs unabhängige Gene editiert wurden, welche am Ertrag und der Produktivität bei domestizierten Kultursorten beteiligt sind. Dabei wiesen die editierten Pflanzen bereits in der folgenden Generation eine erhöhte Fruchtgröße und Fruchtanzahl auf [13]. Neben der Ertragssteigerung zur Minimierung der benötigten Anbaufläche fokussieren sich weitere Strategien auf die Verbesserung der Lagerfähigkeit sowie des Nährstoffprofils von Lebensmitteln, um die Akzeptanz der Verbrauchenden zu erhöhen und die Lebensmittelverschwendung zu verringern. Bedauerlicherweise werden etwa ein Drittel der weltweit produzierten Lebensmittel aufgrund unbeabsichtigter Nachernteverluste oder absichtlicher Verschwendung infolge hoher ästhetischer und geschmacklicher Erwartungen nicht konsumiert. Um diesem Trend entgegenzuwirken, konnte beispielsweise bereits der natürliche enzymatische Bräunungsprozess von Obst und Gemüse durch CRISPR-Cas-basierte Editierung von Polyphenoloxidase-(PPO)-Genen verlangsamt werden. Dabei führte sowohl in Kartoffeln als auch in Auberginen die Induktion von Mutationen in solchen Genen zu einer signifikanten Verringerung der Bräunung im Vergleich zum Wildtyp [14].

Herausforderung: Einsatz von Pestiziden und Düngemitteln

Besonders im Hinblick auf den Einsatz von Düngemitteln und Pestiziden stellt die Editierung mittels des CRISPR-Cas-Systems eine vielversprechende Perspektive für eine nachhaltige Landwirtschaft dar, wobei sowohl die Vermittlung von Resistenzen als auch eine optimierte Nährstoffaufnahme erzielt werden könnte (Abbildung 4). Bislang werden in der Landwirtschaft biotisch bedingte Ernteaussfälle sowie Ertragsverluste aufgrund nährstoffarmer Anbauflächen mithilfe des Einsatzes synthetischer Pflanzenschutz- und Düngemittel kompensiert. Obwohl ihre Nutzung erhebliche Vorteile in Bezug auf die Ertragssummen bietet, sind die damit verbundenen negativen Auswirkungen auf die Umwelt und die Ökosysteme immens. Angesichts dessen ist es entscheidend, adäquate Handlungsstrategien zu entwickeln, die sowohl ertragreiche Ernten als auch effektiven Naturschutz ermöglichen. Neben der Schaffung von Pufferzonen sowie der Förderung nachhaltiger Landwirtschaftspraktiken wie Fruchtwechsel, Zwischenfruchtanbau und Mulchen zur Verringerung der Bodenerosion kann der Einsatz von Kulturpflanzen mit einer optimierten Nährstoffaufnahme den Bedarf an Düngemitteln reduzieren. Dabei liegt in biotechnologischen Editierungsansätzen ein besonderer Schwerpunkt auf der Anpassung des Nährstoffimports durch die Modulation von verfügbaren Transportproteinen und beteiligten Signalkaskaden. In einem CRISPR-Cas9-basierten Baseneditierungsansatz wurde beispielsweise durch den Austausch einer einzelnen Base im *OsNRT1.1B*-Gen, wel-

ches für einen transmembranen Nitrattransporter kodiert, eine erhöhte Nitrataufnahme in Reispflanzen erzielt. Ebenfalls beim Reis konnte durch den CRISPR-Cas9-vermittelten *knockout* des *OsMYB1*-Gens, das für einen auf Phosphatmangel reagierenden Transkriptionsfaktor kodiert, eine erhöhte Phosphataufnahme und -akkumulation erzielt werden, welche auf eine veränderte Expression von Transportern und Signalmolekülen zurückzuführen ist [15].

Neben dem übermäßigen Einsatz von Düngemitteln stellt auch die Verwendung von Pflanzenschutzmitteln und deren Verbreitung über Wasser und Luft eine ernsthafte Bedrohung für unsere Ökosysteme dar. Deren Anreicherung kann nicht nur akute und chronische Gesundheitsprobleme bei Menschen und Tieren verursachen sowie die Resistenzbildung bei Schädlingen fördern, sondern hat auch schwerwiegende Auswirkungen auf die Biodiversität, indem sie nützliche Insektenpopulationen und andere Organismen schädigt. Anstatt pflanzenpathogene Schädlinge – sowie potenziell nützliche Organismen – durch den Einsatz von Pestiziden zu eliminieren, kann der Anbau von Kultursorten mit effizienten Abwehrmechanismen gegen Schädlingsbefall eine nachhaltige Kultivierung ermöglichen. Um solche resistenten Kultivare zu generieren, wurden sowohl diverse klassische Züchtungsmethoden als auch zahlreiche CRISPR-Cas-basierte Strategien verfolgt. Dabei konnten bereits biotechnologisch Resistenzen gegen verschiedene Pilzbefälle in einer Vielzahl von Getreidearten wie Reis, Weizen, Raps und Mais sowie in Obst- und Feldfrüchten wie Wein, Soja, Äpfeln und Kakao vermittelt werden [16]. Ein prominentes Beispiel für das Potenzial solcher Ansätze, welches zugleich die Problematik der monokulturellen Landwirtschaft verdeutlicht, ist die sogenannte Panamakrankheit, welche seit Jahren in Südostasien und Südamerika eine ernsthafte Bedrohung für den Bananenanbau darstellt. Besonders besorgniserregend ist die Tatsache, dass der Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* gegenüber gängigen Fungiziden immun ist und eine Anpassung an den Erreger mittels klassischer Zuchtmethoden bei der samenlosen Banane nicht möglich ist. Erstmals wurde dieses Problem in den 1960er Jahren deutlich, als das damalige Bananen-Kultivar „Gros Michel“ aufgrund der Panamakrankheit weltweit nicht mehr für den Anbau geeignet war. Als Reaktion darauf wechselten Bananenproduzenten zum Anbau der resistenteren Cavendish-Staude, welche jedoch seit den 1990er Jahren von der neuen Pilzrasse *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* (*Tropical Race 4*, TR4) befallen wird, wobei dieses Mal kein alternatives, resistentes Kultivar zur Verfügung steht (Abbildung 5). Daher werden biotechnologische Strategien als wichtige Lösungsansätze für den Bananenanbau betrachtet, um den einzig verbliebenen, samenlosen genetischen Klon Cavendish weiter anbauen zu können. Erst kürzlich konnte durch die Integration des aus der Wildbanane stammenden Resistenzgens *RG2* in die Cavendish-Staude ein TR4-resistentes QCVA4-Kultivar generiert



ABB. 5 Befall mit dem Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* führt zur Panamakrankheit: Die Bananenpflanze verwelkt, bildet keine Früchte mehr und stirbt letztlich ab. Foto: Scot Nelson über www.wikipedia.de.

werden, welches nach diversen Feldversuchen bereits zum menschlichen Verzehr in Australien zugelassen ist. Da es sich jedoch bei dem QCVA4-Kultivar um eine transgene Insertionslinie handelt und gentechnisch veränderte Produkte in vielen Ländern nicht oder nur mit Kennzeichnung zugelassen werden, könnte die Verfolgung eines CRISPR-Cas-basierten Geneditierungsansatzes zur Reaktivierung des bereits im Cavendish-Kultivar vorliegenden, inaktiven *RG2*-Gen eine erfolgversprechende Alternative für die Bananenproduzenten darstellen [17].

Technologische Limitierungen von CRISPR-Cas in der Pflanzenzüchtung

Die biotechnologische Anwendung des CRISPR-Cas-Systems weist aufgrund seines einfachen biochemischen Aufbaus, seiner hohen Effizienz, guten Reproduzierbarkeit sowie seiner schnellen und kostengünstigen Methodik ein beachtliches Potenzial zur effizienten Anpassung von Kulturpflanzen an gegenwärtige klimatische und demographische Herausforderungen auf. Mit zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten bietet sein Einsatz vielfältige Lösungsansätze, wie die Landwirtschaft unter dem Druck der

anthropogenen Erderwärmung rechtzeitig und nachhaltig auf die bevorstehenden Hürden reagieren kann. Nichtsdestotrotz wirkt das CRISPR-Cas-System nur als genomisches Werkzeug und weist einige Einschränkungen auf, weswegen die Anwendung des Systems eher als eine vielversprechende Erweiterung des Werkzeugkastens und weniger als die alleinige Lösung für alle agronomischen Probleme betrachtet werden sollte. Obwohl CRISPR-Cas-basierte Methoden erfolgreich zur gezielten Induktion von Mutationen, Geninsertionen und -deletionen sowie chromosomalen Umstrukturierungen zur Redefinition von Rekombinationsbarrieren angewendet wurden, befindet sich ihr Einsatz in der agrarwissenschaftlichen Forschung noch in den Anfängen und beschränkt sich größtenteils auf *proof of concept*-Ansätze. Obwohl das CRISPR-Cas-System bereits erfolgreich in mindestens 42 Pflanzenarten angewendet wurde, besteht weiterhin Bedarf an effizienten Transformationssystemen für Kulturpflanzen sowie einem universellen Werkzeug, welches eine gleichbleibend hohe Effizienz in Kombination mit einer geringen *off-target*-Aktivität in allen Zielorganismen gewährleistet. So sind die meisten Nutzpflanzen nicht für die in Modellpflanzen gut etablierte Agrobakterien-vermittelte Transformation empfänglich oder erfordern aufwendige Regenerationsverfahren. Um diese grundlegende Einschränkung in gentechnischen Ansätzen zu überwinden sowie trotz geringer Transformationseffizienzen eine erfolgreiche Editierung zu erzielen, werden kontinuierlich Wege zur Verbesserung von Transformationssystemen gesucht und Ansätze zur biochemischen Optimierung der Effizienz gängiger Cas-Nukleasen verfolgt.

Obwohl das CRISPR-Cas-System im Vergleich zu anderen Geneditierungsansätzen eine höhere Zielspezifität aufweist, besteht aufgrund ausreichender Homologien zwischen den gRNAs und *off-target*-Sequenzen die Möglichkeit, neben der Zielsequenz unbeabsichtigterweise weitere genomische Stellen zu editieren. Zwar verursachen CRISPR-Cas-Nukleasen nur wenige ungezielte Mutationen – insbesondere im Vergleich zu den Tausenden, durch herkömmliche Mutagenesezüchtung bereits etablierten Mutationen. Dennoch können bereits im Vorfeld bei der Konzeption des Editierungsansatzes effektive Maßnahmen ergriffen werden, um das Risiko einer *off-target*-Editierung zu minimieren. Während die Auswahl einer geeigneten Zielsequenz mit geringem *off-target*-Potenzial mithilfe verschiedener bioinformatischer Online-Plattformen relativ einfach sein sollte, steigt unweigerlich bei der simultanen Verwendung mehrerer Schnittstellen – wie es bei der *de-novo*-Domestikation oder der Modulation komplexer Prozesse erforderlich ist – das Risiko unbeabsichtigter Editierungen. Wird ein signifikantes *off-target*-Potenzial festgestellt, kann eine verbesserte *off-target*-Spezifität bei geringerem *off-target*-Potenzial durch den Einsatz eines alternativen CRISPR-Cas-basierten Ansatzes ermöglicht werden. In diesem Zusammenhang zeigt insbesondere der Einsatz von Typ-V-CRISPR-Cas-Systemen, von Einzelstrang-

bruch-induzierenden Cas9-Nickasen oder *prime editors* vielversprechendes Potenzial. Eine vollständige Sequenzierung des editierten Organismus und phänotypische sowie biochemische Charakterisierungen können dazu beitragen, die agronomische Bedeutung potenzieller *off-target*-Ereignisse zu bestimmen.

Ein weiterer limitierender Faktor ist, dass sich trotz großer Fortschritte in der Erforschung stressinduzierter Reaktionen die meisten biotechnologischen Ansätze bisher auf die genetische Anpassung an einzelne Stressoren beschränkten. Jedoch zeigen natürliche Umgebungen häufig kombinierte Stressfaktoren, deren Intensität und Häufigkeit durch den Klimawandel steigen dürften, was die Entwicklung von stressresistenten Kulturpflanzen verkomplizieren wird. Um diese biotechnologische Herausforderung anzugehen, wurden bereits vielversprechende Systeme vorgestellt, jedoch erfordert die Etablierung widerstandsfähiger Kultursorten weiterhin auch die molekularbiologische Erforschung der zugrundeliegenden Interaktionsmechanismen stressinduzierter Signalkaskaden, um die Präzisionszüchtung effektiv zu unterstützen. Obwohl die Präzisionszüchtung schneller neue Kultursorten hervorbringen kann als klassische Züchtungsmethoden, benötigt auch diese mehrere Jahre Züchtungsarbeit nach der erfolgreichen Editierung. Neben der Auswahl gewünschter Modifikationen und möglicher Rückkreuzungsschritte zur Eliminierung vorhandener Transgene, müssen die modifizierten Pflanzen umfangreich und vollständig auf ihre veränderten Eigenschaften überprüft werden, um einen sicheren Anbau und Konsum zu gewährleisten.

Während für die Überwindung der technischen Limitierungen der biotechnologischen Anwendung des CRISPR-Cas-Systems weltweit Wissenschaftler/-innen an innovativen Lösungsansätzen forschen, wird jedoch dessen universaler Einsatz durch die Anwendung des Patentrechts und verworrener, länderspezifischer Regelungen erschwert. Dabei wird nicht nur die Nutzung des CRISPR-Cas-Systems zur kommerziellen Anwendung reglementiert, auch der Anbau adaptierter Kultursorten kann sich je nach Rechtssystem als kostspielig erweisen. Obwohl die ersten Publikationen zur biotechnologischen Nutzung des CRISPR-Cas-Systems erst zwölf Jahre zurückliegen, existieren neben den umstrittenen Basispatenten mittlerweile zahlreiche zusätzliche Patente zu verschiedenen Varianten des Systems. Die kommerzielle Nutzung wird zusätzlich durch länderspezifische Auffassungen erschwert, was häufig zu Patentstreitigkeiten führt und Unternehmen vor die Frage stellt, an wen die fälligen Lizenzgebühren zu entrichten sind. Besonders im Hinblick auf bereits existierende Patentierungen großer Saatgutbetriebe, welche ein für Kleinbauern signifikantes wirtschaftliches Hindernis darstellen, äußern Kritiker Besorgnis über den rechtlichen Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO). In diesem Kontext stellt sich auch die Frage hinsichtlich der Patentierung von editierten, transgenfreien Pflanzen, welche auch unter natürlichen Bedingungen hätten entstehen können.

Rechtliche Regulierung von GVO

Für den kommerziellen Einsatz von Genomeditierungstechnologien sind unterstützende staatliche Vorschriften und die Akzeptanz der Verbraucher/-innen erforderlich, wobei das rasche Aufkommen von CRISPR-Cas-Systemen weltweit bestehende Regularien herausfordert und die Anpassung der Gesetzeslagen an diese neuartigen und chancenreichen Techniken erfordert. Während bereits einige Länder in Amerika und Asien entsprechende Richtlinien überarbeitet und erste genomeditierte Produkte für den Konsum freigegeben haben, herrschen in vielen Ländern wie in Neuseeland, Südafrika oder den Mitgliedstaaten der Europäischen Union weiterhin restriktive Vorschriften, was zu einem nicht aufeinander abgestimmten Mosaik von weltweit unterschiedlichen Regulationsmaßnahmen führt. Gerade in der EU besteht seit dem Aufkommen der Pflanzentransformation am Ende des letzten Jahrhunderts eine gewisse Skepsis hinsichtlich der potenziellen Auswirkungen von GVO auf die Umwelt, die menschliche Gesundheit und die biologische Vielfalt, welche dazu geführt hat, dass die Genehmigung und der Einsatz von GVO in der EU strengen regulatorischen Prüfungen unterliegen. So wurde unter Berücksichtigung des Vorsorgeprinzips die GVO-Richtlinie 2001/18/EG verabschiedet, welche komplexe und langfristige Bewertungen vor dem Anbau von GVO erfordert und heutzutage immer noch in Kraft ist. Diese hat dazu geführt, dass nur große Agrarkonzerne solche kostspieligen Verfahren und die damit einhergehende wirtschaftliche Bürde auf sich nehmen konnten, kaum GVOs in der Landwirtschaft eingesetzt wurden und die öffentliche Diskussion zunehmend kritischer wurde. Diese kritische Einstellung spiegelt sich in der Anzahl der EU-Mitgliedstaaten wider, welche den Anbau von GVO in ihrem Hoheitsgebiet auf der Grundlage der „Opt-out“-Richtlinie 2015/412 einschränken oder verbieten [18]. Eine fragwürdige Entwicklung in diesem Zusammenhang stellt die konstant steigende Anzahl an Importzulassungen von GVO in Europa dar, während lediglich eine einzige GVO-Pflanze, der MON180-Mais, mit rückläufigem Trend angebaut wird [19]. Trotz diverser von der Regierung und der EU finanzierter Forschungsprojekte zur Bewertung möglicher Risiken von transgenen Nutzpflanzen, welche keinen Hinweis auf ein erhöhtes Gefahrenpotenzial transgener Pflanzen gegenüber konventionell erzeugten Pflanzen ergaben, wurden die geltenden Regularien nicht angepasst. Aus wissenschaftlicher Sicht noch weniger nachvollziehbar ist das Urteil des Europäischen Gerichtshofs im Jahr 2018, welches die Neubewertung der Gesetzeslage im Hinblick auf transgenfreie, genomeditierte Pflanzen ablehnte, wodurch diese denselben Restriktionen wie transgene Pflanzen unterliegen. Obwohl diese Pflanzen nicht von natürlichen Pflanzen zu unterscheiden sind, war die Grundlage dieser Entscheidung, dass letztlich nicht das Produkt, sondern der Prozess der Züchtung rechtlich ausschlaggebend für die Einstufung ist. Um die Öffentlichkeit und die Politik von der Notwendigkeit einer wissenschaft-

lich begründeten, differenzierten Regulierung zu überzeugen, veröffentlichte eine Reihe von wissenschaftlichen Institutionen wie die deutsche Leopoldina Stellungnahmen, was zu einer Neubewertung der Gesetzeslage im Jahr 2023 führte. Im resultierenden EU-Kommissionsvorschlag werden zwei Klassen von NGT-Pflanzen (neue genomische Techniken) unterschieden, wobei Pflanzen, die als gleichwertig mit konventionell gezüchtete Pflanzen (Kategorie 1) gelten, von den GVO-Vorschriften ausgenommen werden, während für alle anderen NGT-Pflanzen (Kategorie 2) größtenteils die bestehenden Regularien erhalten bleiben. Zudem stimmte das Parlament für eine Kennzeichnungspflicht von NGT-Saatgut sowie ein Verbot von Patenten auf NGT, um neue Abhängigkeiten für Landwirte und Pflanzenzüchter zu vermeiden. Momentan steht allerdings der für eine Verabschiedung der NGT-Verordnung notwendige Mehrheitsbeschluss des Europäischen Rates noch aus. Letztendlich wird die Marktfähigkeit von genomeditierten Lebensmitteln jedoch von der Akzeptanz und dem Interesse der Öffentlichkeit geprägt [18].

Zusammenfassung

Durch die jahrtausendelange Selektionszüchtung ist die genetische Vielfalt unserer Kultursorten stark verarmt, so dass eine Anpassung an die sich immer rapider ändernden klimatischen und demographischen Bedingungen durch konventionelle Züchtungsmethoden zunehmend schwerer wird. Daher werden innovative Handlungsstrategien benötigt, um Ernteerträge unter widrigen Bedingungen – mit kleinstmöglichem Eingriff in die Biodiversität – zu erhalten und somit die Ernährungssicherheit für die wachsende Weltbevölkerung zu gewährleisten. Großes Potenzial, die Zukunft der globalen Landwirtschaft nachhaltig zu gestalten, bieten dabei CRISPR-Cas-basierte Genomeditierungsstrategien, welche es ermöglichen, Nutzpflanzen mit Präzision und Leichtigkeit zu adaptieren. Dabei können nicht nur einzelne Gene gezielt editiert, sondern auch Kopplungsgruppen durch die präzise Induktion von Translokationen und Inversionen modifiziert und neue Rekombinationsereignisse erzielt werden. Somit kann die genetische Variabilität von Kultursorten gesteigert werden, was den Grundstein für eine zukunftsfähige Pflanzenzüchtung legt. Allerdings bleibt es spannend, ob die rechtlichen Bestimmungen und die Kundenakzeptanz das Potenzial der biotechnologischen Anwendung des CRISPR-Cas-Systems in der Landwirtschaft erkennen und eine nachhaltige Bewältigung zukünftiger Herausforderungen ermöglichen.

Summary

CRISPR-Cas for a more sustainable future in agriculture

For thousands of years, selective breeding has greatly impoverished the genetic diversity of our old cultivars so that an adaptation to the ever more rapidly changing climatic and demographic conditions through conventional breeding methods is increasingly difficult. Hence, innovative

strategies are needed to maintain crop yields under adverse conditions without impairing biodiversity thus ensuring food security for the ever-growing world population. Enabling the precise and easy adaptation of crops, CRISPR-Cas-based genome editing strategies offer great potential for shaping the future of global agriculture sustainably. Not only can single genes be specifically edited, but linkage groups can be modified, too, by precisely inducing translocations and inversions, and new recombination events can be obtained. Therefore, genetic variability of cultivars can be increased, which is the basis for sustainable crop breeding. However, it remains to be seen whether legal regulations and customer acceptance will recognize the potential of the biotechnological application of the CRISPR-Cas system in agriculture and enable the sustainable mastery of future challenges.

Schlagworte

CRISPR-Cas, Pflanzenzucht, genome editing, Klimawandel, Nachhaltige Landwirtschaft

Literatur

- [1] M. Jinek *et al.* (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337, 816–821.
- [2] N. Capdeville *et al.* (2023). Getting better all the time – recent progress in the development of CRISPR-Cas-based tools for plant genome engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 79, 102854.
- [3] N. Capdeville *et al.* (2021). Sophisticated CRISPR-Cas tools for fine-tuning plant performance. *J. Plant Physiol.* 257, 153332.
- [4] M. Rönspies *et al.* (2021). CRISPR-Cas-mediated chromosome engineering for crop improvement and synthetic biology. *Nat. Plants* 7, 566–573.
- [5] M. Rönspies *et al.* (2022). Massive crossover suppression by CRISPR-Cas-mediated plant chromosome engineering. *Nat. Plants* 8, 1153–1159.
- [6] Z. Chen *et al.* (2022). Recent advances in crop transformation technologies. *Nat. Plants* 8, 1343–1351.
- [7] X. Li, X. *et al.* (2022). CRISPR-Cas9 Technique for Temperature, Drought, and Salinity Stress Responses. *Curr. Issues Mol. Biol.* 44, 2664–2682.
- [8] A. Chakraborty *et al.* (2024). Gene editing for tolerance to temperature stress in plants: A review. *Plant Gene* 37, 100439.
- [9] M. Clemens *et al.* (2022). VvEPFL9-1 Knock-Out via CRISPR-Cas9 Reduces Stomatal Density in Grapevine. *Front. Plant Sci.* 13, 878001.
- [10] Pairwise and Bayer collaborate to CRISPR short-stem maize. European Biotechnology Life Science and Industry Magazine, <https://t1p.de/g9loa>.
- [11] H. A. Gajardo *et al.* (2023). The Potential of CRISPR-Cas Technology to Enhance Crop Performance on Adverse Soil Conditions. *Plants* 12, 1892.
- [12] C. Wang *et al.* (2020). A cytokinin-activation enzyme-like gene improves grain yield under various field conditions in rice. *Plant Mol. Biol.* 102, 373–388.
- [13] A. Zsögön *et al.* (2018). De novo domestication of wild tomato using genome editing. *Nat. Biotechnol.* 36, 1211–1216.
- [14] A. Tuncel *et al.* (2023). Genome-edited foods. *Nat. Rev. Bioeng.* 1, 799–816.
- [15] L. Sathee *et al.* (2022). Genome Editing Targets for Improving Nutrient Use Efficiency and Nutrient Stress Adaptation. *Front. Genet.* 13, 900897.
- [16] S. Tyagi *et al.* (2021). Engineering disease resistant plants through CRISPR-Cas9 technology. *GM Crops Food* 12, 125–144 (2021).

- [17] J. Dale *et al.* (2017). Transgenic Cavendish bananas with resistance to Fusarium wilt tropical race 4. *Nat. Commun.* 8, 1496.
- [18] H. Puchta (2023). Regulation of gene-edited plants in Europe: from the valley of tears into the shining sun? *aBIOTECH*, <https://doi.org/10.1007/s42994-023-00130-8>.
- [19] L. Castaldi (2023). European Union: Biotechnology and Other New Production Technologies Annual, <https://t1p.de/thkxk>

Verfasst von:



Fabienne Gehrke studierte Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). 2019–2023 Promotion am J. G. Kölreuter Institut für Pflanzenwissenschaften (JKIP) des KIT. Seit 2023 Postdoc am JKIP des KIT.



Niklas Capdeville studierte Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). 2019–2023 Promotion am J. G. Kölreuter Institut für Pflanzenwissenschaften (JKIP) des KIT. Seit 2023 Postdoc am JKIP des KIT.



Laura Merker studierte Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). 2019–2022 Promotion am J. G. Kölreuter Institut für Pflanzenwissenschaften (JKIP) des KIT. 2022–2024 Postdoc am JKIP des KIT. Seit 2024 Projektmanagerin am Steinbeis Europa Zentrum.



Holger Puchta studierte Biochemie an den Universitäten Tübingen und München. Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie, München. 1989–1995 Postdoc am Friedrich-Miescher-Institut in Basel, Schweiz. 1995–2002 Gruppenleiter am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben. Seit 2002 Professor für Molekularbiologie am J. G. Kölreuter Institut für Pflanzenwissenschaften (JKIP) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT).



Korrespondenz

Prof. Dr. Holger Puchta
Joseph Gottlieb Kölreuter Institut für Pflanzenwissenschaften (JKIP), Abteilung Molekularbiologie
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Fritz-Haber-Weg 4, Gbd. 30.43
D-76131 Karlsruhe
E-Mail: holger.puchta@kit.edu



Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**GEMEINSAM
FÜR DIE**

BIEWISSENSCHAFTEN

Gute Gründe, dem VBIO beizutreten:

- Werden Sie Teil des größten Netzwerks von Biowissenschaftlern in Deutschland.
- Unterstützen Sie uns, die Interessen der Biowissenschaften zu vertreten.
- Nutzen Sie Vorteile im Beruf.
- Bleiben Sie auf dem Laufenden – mit dem VBIO-Newsletter und dem Verbandsjournal „Biologie in unserer Zeit“.
- Treten Sie ein für die Zukunft der Biologie.



www.vbio.de

Jetzt beitreten!

