

Stellungnahme der ZKBS zu neuen Techniken für die Pflanzenzüchtung

I. Anlass

Der Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO) wird in der Europäischen Union (EU) rechtlich durch die Richtlinie über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt (RL 2001/18/EG) und durch die Richtlinie zur Anwendung genetisch veränderter Mikroorganismen in geschlossenen Systemen (RL 2009/41/EG) geregelt. Diese Richtlinien werden in Deutschland im Wesentlichen durch das Gentechnikgesetz (GenTG) in nationales Recht umgesetzt. In jüngerer Zeit wurden neue molekularbiologische Techniken entwickelt, für die zu klären ist, ob die resultierenden Organismen im Sinne dieser Rechtsvorschriften gentechnisch verändert sind.

Aus diesem Grund wurde in der EU auf Vorschlag der *Committees of Competent Authorities* die *New Techniques Working Group* (NTWG) eingerichtet, in die jeder EU-Mitgliedstaat zwei Experten entsenden konnte. Die NTWG hat, organisatorisch unterstützt von der Europäischen Kommission, neue molekularbiologische Techniken beschrieben und daraufhin geprüft, ob sie im Sinne der EU-Richtlinien 2001/18/EG und 2009/41/EG zu GMO führen oder nicht. Die Aufgabe der Arbeitsgruppe war es, mit dem Bericht ihre Erkenntnisse den *Competent Authorities* der EU-Staaten als technischen Ratschlag verfügbar zu machen. Im Dezember 2011 legte die NTWG der Europäischen Kommission einen abschließenden Bericht (*final report*) vor. Anfragen von Landesbehörden haben die ZKBS veranlasst, vor dem Hintergrund der bisher auf europäischer Ebene getroffenen Bewertung eine Stellungnahme zur Einordnung dieser neuen Techniken gemäß der genannten europäischen Richtlinien und des deutschen GenTG abzugeben. Die Bewertung erfolgt hier im Hinblick auf die Anwendung der neuen Techniken an Pflanzen bzw. Pflanzenzellen.

II. Rechtliche Grundlagen

Die Richtlinie 2001/18/EG, die Richtlinie 2009/41/EG und das GenTG beinhalten jeweils die Definition für GMO sowie nicht vollständige, indikative Listen von Verfahren zur gentechnischen Veränderung von Organismen und von Verfahren, die im Sinne der Vorschriften nicht zu GMO führen. Unter Anwendung dieser Definitionen und Listen hat die ZKBS fachlich geprüft, welche der neuen Techniken zu einer gentechnischen Veränderung des resultierenden Organismus führen.

Gemäß Art. 2 Nr. 2 der RL 2001/18/EG ist ein GMO

"[...] an organism, with the exception of human beings, in which the genetic material has been altered in a way that does not occur naturally by mating and/or natural recombination; within the terms of this definition:

- (a) genetic modification occurs at least through the use of the techniques listed in Annex I A, part 1;
- (b) the techniques listed in Annex I A, part 2, are not considered to result in genetic modification; [...]"

und laut Anhang I A Teil 1 gilt:

"Techniques of genetic modification referred to in Article 2(2)(a) are inter alia:

- (1) recombinant nucleic acid techniques involving the formation of new combinations of genetic material by the insertion of nucleic acid molecules produced by whatever means outside an organism, into any virus, bacterial plasmid or other vector system and their incorporation into a host organism in which they do not naturally occur but in which they are capable of continued propagation;
- (2) techniques involving the direct introduction into an organism of heritable material prepared outside the organism including micro-injection, macro-injection and micro-encapsulation;
- (3) cell fusion (including protoplast fusion) or hybridisation techniques where live cells with new combinations of heritable genetic material are formed through the fusion of two or more cells by means of methods that do not occur naturally."

und laut Anhang I A Teil 2 gilt:

"Techniques referred to in Article 2(2)(b) which are not considered to result in genetic modification, on condition that they do not involve the use of recombinant nucleic acid molecules or genetically modified organisms made by techniques/methods other than those excluded by Annex I B:

- (1) in vitro fertilisation,
- (2) natural processes such as: conjugation, transduction, transformation,
- (3) polyploidy induction."

Dabei bilden gemäß Art. 3 Abs. 1 folgende Verfahren eine Ausnahme; sie führen keine gentechnische Veränderung eines Organismus herbei:

"(1) This Directive shall not apply to organisms obtained through the techniques of genetic modification listed in Annex I B."

und laut Anhang I B gilt:

"Techniques/methods of genetic modification yielding organisms to be excluded from the Directive, on the condition that they do not involve the use of recombinant nucleic acid molecules or genetically modified organisms other than those produced by one or more of the techniques/methods listed below are:

- (1) mutagenesis,
- (2) cell fusion (including protoplast fusion) of plant cells of organisms which can exchange genetic material through traditional breeding methods."

Gemäß Art. 2 Buchst. b der RL 2009/41/EG ist ein GVO

„[...] a micro-organism in which the genetic material has been altered in a way that does not occur naturally by mating and/or natural recombination; within the terms of this definition:

- (i) genetic modification occurs at least through the use of the techniques listed in Annex I, Part A;
- (ii) the techniques listed in Annex I, Part B, are not considered to result in genetic modification; [...]"

und laut Anhang I Teil A gilt:

"Techniques of genetic modification referred to in point (b)(i) of Article 2 are, inter alia:

- 1. Recombinant nucleic acid techniques involving the formation of new combinations of genetic material by the insertion of nucleic acid molecules produced by whatever means outside an organism, into any virus, bacterial plasmid or other vector system and their

incorporation into a host organism in which they do not naturally occur but in which they are capable of continued propagation.

2. *Techniques involving the direct introduction into a micro-organism of heritable material prepared outside the micro-organism, including micro-injection, macro-injection and micro-encapsulation.*
3. *Cell fusion or hybridisation techniques where live cells with new combinations of heritable genetic material are formed through the fusion of two or more cells by means of methods that do not occur naturally.”*

und laut Anhang I Teil B gilt:

“Techniques referred to in point (b)(ii) of Article 2 which are not considered to result in genetic modification, on condition that they do not involve the use of recombinant-nucleic acid molecules or GMMs made by techniques/methods other than the techniques/methods excluded by Part A of Annex II:

1. *in vitro fertilisation;*
2. *natural processes such as: conjugation, transduction, transformation;*
3. *polyploidy induction.”*

Dabei bilden gemäß Art. 3 Abs. 1 folgende Verfahren eine Ausnahme; sie führen keine gentechnische Veränderung eines Organismus herbei:

„1. Without prejudice to Article 4(1), this Directive shall not apply:

- (a) *where genetic modification is obtained through the use of the techniques/methods listed in Annex II, Part A; [...]*”

und laut Anhang II Teil A gilt:

“Techniques or methods of genetic modification yielding micro-organisms to be excluded from this Directive on condition that they do not involve the use of recombinant-nucleic acid molecules or GMMs other than those produced by one or more of the techniques/methods listed below:

1. *Mutagenesis.*
2. *Cell fusion (including protoplast fusion) of prokaryotic species that exchange genetic material by known physiological processes.*
3. *Cell fusion (including protoplast fusion) of cells of any eukaryotic species, including production of hybridomas and plant cell fusions.*
4. *Self-cloning consisting in the removal of nucleic acid sequences from a cell of an organism which may or may not be followed by reinsertion of all or part of that nucleic acid (or a synthetic equivalent), with or without prior enzymic or mechanical steps, into cells of the same species or into cells of phylogenetically closely related species which can exchange genetic material by natural physiological processes where the resulting micro-organism is unlikely to cause disease to humans, animals or plants.*

Self-cloning may include the use of recombinant vectors with an extended history of safe use in the particular micro-organisms.”

Gemäß § 3 Nr. 3 GenTG ist ein

„gentechnisch veränderter Organismus ein Organismus, mit Ausnahme des Menschen, dessen genetisches Material in einer Weise verändert worden ist, wie sie unter natürlichen Bedingungen durch Kreuzen oder natürliche Rekombination nicht vorkommt; ein gentechnisch veränderter Organismus ist auch ein Organismus, der durch Kreuzung oder natürliche Rekombination zwischen gentechnisch veränderten Organismen oder mit einem oder mehreren gentechnisch veränderten Organismen oder durch andere Arten der Vermehrung eines gentechnisch veränderten Organismus entstanden ist, sofern das genetische Material des Organismus Eigenschaften aufweist, die auf gentechnische Arbeiten zurückzuführen sind,“

und gemäß § 3 Nr. 3a. GenTG sind

„Verfahren der Veränderung genetischen Materials in diesem Sinne [...] insbesondere

- a) Nukleinsäure-Rekombinationstechniken, bei denen durch die Einbringung von Nukleinsäuremolekülen, die außerhalb eines Organismus erzeugt wurden, in Viren, Viroide, bakterielle Plasmide oder andere Vektorsysteme neue Kombinationen von genetischem Material gebildet werden und diese in einen Wirtsorganismus eingebracht werden, in dem sie unter natürlichen Bedingungen nicht vorkommen,
- b) Verfahren, bei denen in einen Organismus direkt Erbgut eingebracht wird, welches außerhalb des Organismus hergestellt wurde und natürlicherweise nicht darin vorkommt, einschließlich Mikroinjektion, Makroinjektion und Mikroverkapselung,
- c) Zellfusionen oder Hybridisierungsverfahren, bei denen lebende Zellen mit neuen Kombinationen von genetischem Material, das unter natürlichen Bedingungen nicht darin vorkommt, durch die Verschmelzung zweier oder mehrerer Zellen mit Hilfe von Methoden gebildet werden, die unter natürlichen Bedingungen nicht vorkommen, [...]"

und gemäß § 3 Nr. 3b. GenTG gilt nicht als Verfahren der Veränderung genetischen Materials:

„[...]“

- a) In-vitro-Befruchtung,
- b) natürliche Prozesse wie Konjugation, Transduktion, Transformation,
- c) Polyploidie-Induktion, es sei denn, es werden gentechnisch veränderte Organismen verwendet oder rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die im Sinne von den Nummern 3 und 3a hergestellt wurden, eingesetzt. Weiterhin gelten nicht als Verfahren der Veränderung genetischen Materials
 - a) Mutagenese und
 - b) Zellfusion (einschließlich Protoplastenfusion) von Pflanzenzellen von Organismen, die mittels herkömmlicher Züchtungstechniken genetisches Material austauschen können, es sei denn, es werden gentechnisch veränderte Organismen als Spender oder Empfänger verwendet,“

und laut § 3 Nr. 3c. GenTG gilt:

„sofern es sich nicht um ein Vorhaben der Freisetzung oder des Inverkehrbringens handelt und sofern keine gentechnisch veränderten Organismen als Spender oder Empfänger verwendet werden, gelten darüber hinaus nicht als Verfahren der Veränderung genetischen Materials

- a) Zellfusion (einschließlich Protoplastenfusion) prokaryotischer Arten, die genetisches Material über bekannte physiologische Prozesse austauschen,
- b) Zellfusion (einschließlich Protoplastenfusion) von Zellen eukaryotischer Arten, einschließlich der Erzeugung von Hybridomen und der Fusion von Pflanzenzellen,
- c) Selbstklonierung nicht pathogener, natürlich vorkommender Organismen, bestehend aus
 - aa) der Entnahme von Nukleinsäuresequenzen aus Zellen eines Organismus,
 - bb) der Wiedereinführung der gesamten oder eines Teils der Nukleinsäuresequenz (oder eines synthetischen Äquivalents) in Zellen derselben Art oder in Zellen phylogenetisch eng verwandter Arten, die genetisches Material durch natürliche physiologische Prozesse austauschen können, und
 - cc) einer eventuell vorausgehenden enzymatischen oder mechanischen Behandlung.

Zur Selbstklonierung kann auch die Anwendung von rekombinanten Vektoren zählen, wenn sie über lange Zeit sicher in diesem Organismus angewandt wurden.“

Zwischen den hier zitierten Texten der Richtlinien und des GenTG gibt es Unterschiede. In den europäischen Richtlinien 2001/18/EG und 2009/41/EG heißt es in Anhang I A Teil 1 Nr. 1 respektive Anhang I Teil A Nr. 1, dass die in einen Empfängerorganismus eingebrachte rekombinante Nukleinsäure "capable of continued propagation" sein muss, damit die Bedingung für ein Verfahren der gentechnischen Veränderung erfüllt ist. Im deutschen GenTG wurde dieser Zusatz entfernt. Diese Bedingung wurde mit dem Zweiten GenTG-Änderungsgesetz wie folgt begründet:

„[...] Vom Gentechnikgesetz müssen weiterhin Organismen erfasst werden, die durch die Verwendung replikationsdefekter Viren (z. B. Adeno- oder Retroviren) gentechnisch

verändert wurden. Diese Viren sind im Wirtsorganismus nicht mehr replizierbar (vermehrbar); die gentechnische Veränderung wird aber gemeinsam mit dem Wirtsorganismus repliziert (vermehrt). Um derartige Missdeutungen zu vermeiden, sollte die Passage aus der EU-Richtlinie nicht übernommen werden.“

Diese Begründung ist wissenschaftlich nicht korrekt. Wenn die genannten replikationsdefekten Viren in Chromosomen der Wirtszelle integrieren und somit durch den Wirt dauerhaft mitrepliziert werden, liegt nach GenTG eindeutig ein GVO vor (§ 3 Nr. 3a. Buchst. b GenTG). Hier ist keinerlei „Missdeutung“ möglich. Deshalb entfällt nach Einschätzung der ZKBS die Notwendigkeit für die Abweichung von den europäischen Richtlinien.

III. Weitere Grundsätze für die Beurteilung der neuen Techniken

Das GenTG und die RL 2001/18/EG und RL 2009/41/EG definieren rekombinante Nukleinsäure als neukombiniertes genetisches Material. Die ZKBS schließt sich der Meinung der NTWG an, dass ein Segment mindestens 20 Nukleotidpaare (NP) umfassen muss, um zu einer rekombinanten Nukleinsäure zu führen. Eine spezifische Sequenz von 20 NP kommt bei zufälliger Verteilung der NP statistisch einmal in 4^{20} NP ($1,1 \times 10^{12}$ NP) vor. Folglich sind bestimmte Sequenzen von weniger als 20 NP in großen Genomen, wie z. B. Mais (das haploide Genom hat $2,5 \times 10^9$ NP), mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zu erwarten. Eine absichtliche Änderung von weniger als 20 NP kann von dem zufälligen Vorkommen dieser Sequenz nicht hinreichend sicher unterschieden werden. Bestimmte Sequenzen von weniger als 20 NP können zwar nachgewiesen werden, eignen sich jedoch nicht zur Bestimmung ihrer Herkunft. Sie sind nicht von den durch konventionelle Mutagenese oder natürliche Mutation entstandenen genetischen Veränderungen (zufälliges Vorkommen) zu unterscheiden (Cao et al., 2011)¹. Die durch Mutagenese-Verfahren induzierten Mutationen gelten gemäß § 3 Nr. 3b. Satz 2 Buchst. a GenTG (Mutagenese) nicht als gentechnische Veränderungen.

Bei einigen Techniken wird in einem Zwischenschritt ein GVO erzeugt (intermediärer Organismus), von dem im weiteren Verlauf Nachkommen selektiert werden, die nicht mehr Träger der gentechnischen Veränderung sind. Hierbei sind zwei Typen von GVO zu unterscheiden. Bei einem Typ liegt eine chromosomale Integration der übertragenen Nukleinsäure vor (intermediärer Organismus Typ A; wie z. B. bei Reverser Züchtung (IV.7), Cisgenese (IV.3) und Pfropfung (IV.4)). Dieses genetische Material kann in einem weiteren Schritt, z. B. durch Kreuzung und Segregation bzw. durch andere Verfahren wieder entfernt werden. Bei dem anderen Typ (intermediärer Organismus Typ B) liegt die übertragene Nukleinsäure weder chromosomal integriert vor, noch kann sie autonom replizieren, so dass sie nicht an die Nachkommen weitergegeben wird. Sie liegt zeitlich begrenzt in dem Organismus vor (wie z. B. bei Zinkfingernuklease-Technik (IV.2) und RNA-abhängiger DNA-Methylierung (IV.6)) und geht verloren. Die ZKBS schließt sich der Bewertung der NTWG an, dass Nachkommen von GVO, die nachweislich keine gentechnisch veränderte Nukleinsäure mehr enthalten, aus wissenschaftlicher Sicht keine GVO sind. Deswegen unterscheidet die ZKBS bei der Anwendung einer Technik gegebenenfalls zwischen Ausgangsorganismus, intermediärem Organismus, der ein GVO ist, und dem resultierenden Organismus, der kein GVO ist.

¹ In den sequenzierten Genomen von 80 Isolaten der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) aus verschiedenen geographischen Regionen wurden 810.467 Insertionen bzw. Deletionen von ein bis 20 NP gefunden.

IV. Neue Techniken

IV.1 Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese (OgM)

Technik

Bei der OgM werden Oligonukleotide mit einer Länge von ca. 20 bis 100 Nukleotiden in die Zelle eingebracht, um an einer bestimmten Sequenz ortsspezifisch Mutationen zu erzeugen. Die Mutationen können Austausch von einzelnen oder wenigen NP, kurze Deletionen oder auch kurze Insertionen zelleigener DNA sein. Die Technik beruht auf der sequenzspezifischen Wechselwirkung des Oligonukleotides mit seiner Zielsequenz im Genom der Zelle (*gene targeting*). Es werden verschiedene Arten von Oligonukleotiden eingesetzt (Laible et al., 2006; Simon et al., 2008; Storici, 2008). Dazu zählen einzelsträngige DNA mit z. B. einem oder wenigen unterschiedlichen Nukleotiden zur Zielsequenz, chimäre Oligonukleotide mit Anteilen von RNA und DNA, Oligonukleotide, die durch Hoogsteen-Wasserstoffbrücken eine Triple-Helix mit der Zielsequenz bilden (*triplex-forming oligonucleotides*; TFO) und RNA-Oligonukleotide mit einem oder wenigen abweichenden Nukleotiden. Einige der Oligonukleotide werden auch mit veränderten Nukleobasen und/oder modifizierter Ribose zwecks Erhöhung der Bindung zur Zielsequenz eingesetzt, sogenannte *locked nucleic acids* (LNA). Für die Triple-Helix-Bildung eignen sich ebenso über Peptidbindungen verknüpfte Nukleobasen (sog. *peptide nucleic acids*; PNA).

Die zellulären Mechanismen, die jeweils zur Mutation führen, sind nicht völlig verstanden. Die DNA-Oligonukleotide lösen Mutationen möglicherweise nach dem Prinzip der Genkonversion aus. Die Triple-Helix-Regionen, die durch TFO entstehen, stellen Angriffspunkte für zelluläre DNA-Reparaturenzyme dar, so dass ein Doppelstrangbruch (DSB) entstehen kann. Dieser führt zur Mutation durch nicht-homologe Verknüpfung der DNA-Enden (*non-homologous end joining*; NHEJ) oder zu einer kleinen Deletion oder Insertion (von zelleigener DNA). RNA-Oligonukleotide dienen möglicherweise als Matrize bei DNA-Reparatur und lösen dabei die Mutation aus.

Die Gen-spezifische Mutagenese mit Oligonukleotiden war bereits in verschiedenen Agrarpflanzen (Raps, Mais, Tabak, Reis, Weizen) erfolgreich, z. B. zur Erzeugung von Herbizid-Toleranzen. Andere Bezeichnungen für die Technik sind u. a. auch *oligonucleotide-directed gene repair* und *oligonucleotide-targeted gene editing*.

Schlussfolgerung und Bewertung

- Die Oligonukleotide, die in die Zellen eingebracht werden, sind keine neuen Kombinationen genetischen Materials, denn ihre Sequenz richtet sich nach der Zielsequenz (Watson-Crick-Basenpaarung oder Hoogsteen-Basenpaarung), ggf. mit einer Abweichung von einem oder wenigen Nukleotiden.
Bei den eingebrachten Oligonukleotiden handelt es sich nicht um rekombinante Nukleinsäuren gemäß § 3 Nr. 3a. Buchst. a GenTG. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Anhang I A Teil 1 Nr. 1 RL 2001/18/EG bzw. Anhang I Teil A Nr. 1 RL 2009/41/EG.
- Die Oligonukleotide, einschließlich der chemisch veränderten Nukleinsäuren und Derivate, sind gemäß § 3 Nr. 3a. Buchst. b GenTG kein genetisches Material oder Erbgut. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Anhang I A Teil 1 Nr. 2 RL 2001/18/EG bzw. Anhang I Teil A Nr. 2 RL 2009/41/EG.
- Die Oligonukleotide wirken wie Mutagene und rufen Mutationen von einem oder wenigen NP hervor, wie sie gleichermaßen auch spontan oder nach Anwendung von Mutagenen auftreten können und sind damit nicht von spontanen Mutationen oder von Mutationen, die durch Mutagenese hervorgerufen werden, unterscheidbar. Durch Mutagene erzeugte genetische Varianten sind gemäß § 3 Nr. 3b. Satz 2 Buchst. a

GenTG (Mutagenese) keine GVO. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Anhang I B Nr. 1 RL 2001/18/EG bzw. Anhang II Teil A Nr. 1 RL 2009/41/EG.

Es handelt sich bei den durch die OgM-Technik entstandenen Organismen nicht um GVO. Diese Bewertung stimmt mit der von der NTWG vorgenommenen Bewertung überein.

IV.2 Zinkfingernuklease-Technik

Technik

Diese Technik erlaubt das gezielte Einbringen von Mutationen einschließlich großer DNA-Segmente und Deletionen in ein Genom. Zinkfingernukleasen (ZFN) sind chimäre Proteine, die aus zwei funktionellen Domänen zusammengesetzt sind. Eine Zinkfingerdomäne bindet an eine spezifische Nukleotidsequenz (Zielsequenz) in doppelsträngiger DNA. Die zweite Domäne besitzt die Endonukleaseaktivität des *FokI*-Restriktionsenzym. Somit erzeugen ZFN neben ihrer Zielsequenz einen DNA-Einzelstrangbruch; binden zwei ZFN-Enzyme gegenläufig, können sie einen DSB hervorrufen. An diesem DSB können abhängig von der angewendeten Technik unterschiedliche genetische Veränderungen eintreten.

ZFN können auf unterschiedliche Weise in einen Organismus eingebracht werden. Die Gene für ZFN können auf einer vorübergehend anwesenden rekombinanten DNA im Organismus vorliegen. Hierbei entsteht ein intermediärer Organismus Typ B. Alternativ kann direkt ZFN-mRNA oder ZFN-Protein eingebracht werden.

Ähnlich wie ZFN werden auch andere DSB-erzeugende Endonukleasen mit Zielsequenzen, wie z. B. Meganukleasen (Grizot et al., 2010) und *transcription activator like endonucleases* (TALEN) (Christian et al., 2010) verwendet.

Es gibt drei ZFN-Techniken:

Bei der ZFN-Technik 1 (ZFN1) kann der erzeugte DSB von der zelleigenen DNA-Reparatur mittels NHEJ repariert werden. Dabei entstehen zufällige Mutationen, die ein NP oder wenige betreffen oder kurze Insertionen (zelleigene DNA) oder kurze Deletionen sein können. Werden zwei ZFN-Paare mit weit auseinander liegenden Zielsequenzen eingesetzt, lässt sich eine große Deletion erzeugen, die von den Zielsequenzen begrenzt ist.

Bei der ZFN-Technik 2 (ZFN2) wird, zusammen mit ZFN, DNA in den Organismus eingebracht. Die eingebrachte DNA kann mehrere tausend NP umfassen und ist homolog zu den Flanken des von den ZFN eingeführten DSB. Die DNA unterscheidet sich an dieser Stelle durch eine Mutation von der endogenen Sequenz. Bei der Reparatur des DSB mit Hilfe der eingeführten DNA wird der Nukleotidaustausch im Genom verankert.

Bei der ZFN-Technik 3 (ZFN3) wird zusammen mit ZFN DNA in den Organismus eingebracht, die die Integration von mehreren tausend NP langen DNA-Segmenten an der Zielsequenz ermöglicht (gerichtete Integration). Das DNA-Segment ist von Abschnitten flankiert, die homolog zu der DNA um die Zielsequenz sind. Bei der Reparatur des DSB wird das DNA-Segment chromosomal integriert.

Schlussfolgerung und Bewertung

Einbringen der ZFN

- Die ZFN können über vorübergehend anwesende rekombinante DNA im Organismus erzeugt werden (intermediärer Organismus Typ B). Gemäß § 3 Nr. 3a. Buchst. a GenTG ist der intermediäre Organismus ein GVO. Gemäß Anhang I A Teil 1 Nr. 1 RL 2001/18/EG bzw. Anhang I Teil A Nr. 1 RL 2009/41/EG handelt es sich nicht um einen GVO.

- Werden in der Zelle ZFN durch Einbringen von isolierter mRNA oder isolierten Proteinen bereitgestellt, wird kein Erbgut in die Zelle gebracht. RNA ist für Zellen kein genetisches Material.
Die so erzeugten Zellen mit ZFN sind gemäß § 3 Nr. 3a. Buchst. b GenTG keine GVO. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Anhang I A Teil 1 Nr. 2 RL 2001/18/EG bzw. Anhang I Teil A Nr. 2 RL 2009/41/EG.

Resultierende Organismen

- Bei der ZFN1 besitzen die Nachkommen des intermediären Organismus (resultierende Organismen) lediglich Mutationen, die durch den natürlichen Prozess des NHEJ entstanden sind. Diese Arten von Mutationen können gleichermaßen über natürliche Prozesse oder bei der konventionellen Züchtung (Mutagenese) entstehen; dies gilt auch für die Erzeugung großer Deletionen.
Bei dem resultierenden Organismus handelt es sich gemäß § 3 Nr. 3b. Satz 2 Buchst. a GenTG (Mutagenese) nicht um einen GVO. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Anhang I B Nr. 1 RL 2001/18/EG bzw. Anhang II Teil A Nr. 1 RL 2009/41/EG.
- Die bei der ZFN2 zugesetzte DNA besitzt gegenüber der endogenen DNA lediglich eine Mutation von einem oder wenigen NP bzw. eine kleine Insertion oder Deletion (weniger als 20 NP). Es handelt sich nach der unter „III. Weitere Grundsätze für die Beurteilung der neuen Techniken“ gegebenen Definition nicht um eine rekombinante Nukleinsäure. Der resultierende Organismus ist somit nicht Träger einer gentechnischen Veränderung.
Bei dem resultierenden Organismus handelt es sich gemäß § 3 Nr. 3a. Buchst. a GenTG nicht um einen GVO. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Anhang I A Teil 1 Nr. 1 RL 2001/18/EG bzw. Anhang I Teil A Nr. 1 RL 2009/41/EG.
- Die bei der ZFN3 zugesetzte DNA ist eine rekombinante Nukleinsäure. Integriert diese rekombinante DNA chromosomal, dann ist der resultierende Organismus Träger einer gentechnischen Veränderung.
Bei dem resultierenden Organismus handelt es sich gemäß § 3 Nr. 3 GenTG um einen GVO. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Art. 2 RL 2001/18/EG bzw. Art 2 RL 2009/41/EG.

Bis auf die Bewertung des intermediären Organismus Typ B stimmt die hier vorgenommene Bewertung mit der von der NTWG vorgenommenen überein.

IV.3 Cisgenese und Intragenese

Technik

Bei der Cisgenese wird ein komplettes Gen einschließlich seiner natürlichen Promotor- und Terminatorregionen und Introns aus einem Organismus der gleichen Art oder einer kreuzungskompatiblen Art (das Cisgen) in das Genom eines Empfängerorganismus eingebracht (Jacobsen und Schouten, 2007; Rommens, 2007). Cisgene weisen häufig Sequenzidentität oder -ähnlichkeit zur Nukleotidsequenz des Empfängerorganismus auf. Die Übertragung der Cisgene erfolgt mit Hilfe von Verfahren, die auch in der Gentechnik eingesetzt werden. Zur Detektion transformierter Organismen werden zusätzlich Markergene zusammen mit dem Cisgen übertragen (intermediärer Organismus Typ A). Diese Markergene können über weitere Verfahren entfernt werden. In dem daraus resultierenden Organismus verbleiben allenfalls kurze Nukleotidsequenzen von bis zu ca. 10 NP (z. B. Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen). Wenn die Übertragung durch T-DNA-Transfer aus *Agrobacterium* erfolgt (Pitzsche und Hirt, 2010), können T-DNA-Bordersequenzen im Empfänger verbleiben. Der Ort im Genom, wo das Cisgen integriert, ist z. B. bei T-DNA-Transfer zufällig, so dass ein dort lokalisiertes Gen betroffen sein kann. Bei der gezielten Integration (z. B. bei Anwendung der ZFN-Technik) kann eine Auswirkung auf andere *open reading frames* (ORF) vermieden werden. Durch Cisgenese werden genetische

Veränderungen unmittelbar herbeigeführt, die auch durch Kreuzungen erreichbar sind, die allerdings länger dauern und weitere genetische Veränderungen des Empfängerorganismus bewirken.

Bei der Intragenese stammt die übertragene DNA ebenfalls aus Organismen der gleichen oder einer kreuzungskompatiblen Art. Aber die DNA (das Intragen) ist z. B. eine Kombination aus verschiedenen Genabschnitten, ist ein Gen mit anderen als den nativen Promotor- und Terminatorregionen oder auch eine Anordnung des Gens in Sinn- und Gegensinn. Hierdurch lassen sich neue, mit konventioneller Züchtung nicht erreichbare Ziele verwirklichen.

Schlussfolgerung und Bewertung

Cisgenese

- Solange Bordersequenzen und/oder Markergene vorhanden sind, ist der resultierende Organismus gemäß § 3 Nr. 3 GenTG ein GVO. Die gleiche Bewertung ergibt sich aus Art. 2 RL 2001/18/EG und Art. 2 RL 2009/41/EG.
- Falls keine Bordersequenzen vorhanden sind und die Markergene entfernt wurden, gleicht die Cisgenese der Selbstklonierung, denn der resultierende Organismus weist keine fremden Nukleinsäuren mehr auf.
Der resultierende Organismus ist gemäß § 3 Nr. 3c. Buchst. c GenTG und Anhang II Teil A Nr. 4 RL 2009/41/EG kein GVO, solange er ausschließlich im geschlossenen System verwendet wird. Gemäß Art. 2 RL 2001/18/EG ist der resultierende Organismus als GVO zu behandeln, wenn er für Freisetzungen und/oder Inverkehrbringen genutzt wird.

Intragenese

- Die Intragenese verwendet ein DNA-Konstrukt, wie es weder im Empfänger- noch im Spenderorganismus vorkommt aber aus Nukleotidsequenzen des Spenders besteht. Es handelt sich um DNA, die mit Nukleinsäure-Rekombinationstechniken erzeugt wurde.
Der resultierende Organismus ist gemäß § 3 Nr. 3a. Buchst. a GenTG ein GVO. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Anhang I A Teil 1 Nr. 1 RL 2001/18/EG bzw. Anhang I Teil A Nr. 1 RL 2009/41/EG.

Die hier vorgenommenen Bewertungen stimmen mit den durch die NTWG vorgenommenen Bewertungen überein. Abweichend von dem *final report* der NTWG stellt die ZKBS fest, dass die Cisgenese nur dann der Selbstklonierung gleicht, wenn keine Bordersequenzen und keine Markergene im Cisgen vorhanden sind.

IV. 4 Pfropfung

Technik

Die Pfropfung ist eine klassische Methode der Veredelung von Gehölzen und krautigen Pflanzen, bei der einem Wurzelstock ein Spross bzw. Edelreis angefügt wird. Über Kallusbildung verwachsen beide Teile und es kommt zur Verknüpfung des Leitsystems. In der Region der Verwachsung kann es zum Austausch von Organellen und Bildung eines Mischgewebes kommen (Stegemann und Bock, 2009). Chromosomale Gene gelangen nachweislich nicht von der Wurzel in den Spross und umgekehrt (Stegemann und Bock, 2009). Für eine Pfropfung können gentechnisch veränderte Pflanzen (gv-Pflanzen) als Wurzelstock oder Spross genutzt werden. Der gv-Anteil der chimären Pflanze kann den nicht-gv-Anteil beeinflussen. So kann ein geeigneter gv-Wurzelstock z. B. Sprosswachstum und Fruchtbildung der gepfropften Pflanzen auf übersalzenen Böden erhöhen (Ghanem et al., 2011). Die Weiterleitung von kurzen RNA-Molekülen aus der Wurzel in den Spross, die z.

B. zur Regulation durch RNA-Interferenz und RNA-abhängiger DNA-Methylierung führen, wurde beobachtet (Shaharuddin et al., 2006; Molnar et al., 2010).

Schlussfolgerung und Bewertung

- Bei Verwendung einer gv-Pflanze für Wurzelstock oder Spross besitzt der chimäre Organismus einen gv-Anteil, der reproduktiv sein kann: Der Spross über Blüten- und Samenbildung und der Wurzelstock über Wurzeltriebe (mit Blüten- und Samenbildung). Die chimären Pflanzen mit entweder gv-Wurzelstock oder gv-Spross sind GVO gemäß § 3 Nr. 3 GenTG. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Art. 2 RL 2001/18/EG bzw. Art. 2 RL 2009/41/EG.
- Der nicht-gv-Anteil der chimären Pflanze erfährt keine genetische Veränderung seines Erbgutes. Wird ein nicht-gv-Spross auf einen gv-Wurzelstock gepfropft, produziert der Spross Samen und Früchte, die keine gentechnische Veränderung im Erbgut tragen, und dementsprechend weisen auch die Nachkommen keine gentechnische Veränderung auf.
Die Nachkommen sind gemäß § 3 Nr. 3 GenTG keine GVO. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Art. 2 RL 2001/18/EG bzw. Art. 2 RL 2009/41/EG.
- Wurde ein gv-Spross auf einen nicht-gv-Wurzelstock gepfropft, sind Pflanze, Früchte und Samen (also die Nachkommen) Träger einer gentechnischen Veränderung.
Bei den Pflanzen und deren Nachkommen handelt es sich gemäß § 3 Nr. 3 GenTG um GVO. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Art. 2 RL 2001/18/EG bzw. Art. 2 RL 2009/41/EG.

Die hier vorgenommene Bewertung der Pfropfungstechnik bzw. der daraus hervorgehenden Samen und Früchte stimmt mit der Bewertung durch die NTWG überein.

IV.5 Agroinfiltration

Technik

Bei dieser Technik wird Gewebe einer Pflanze mit einer Suspension von *Agrobacterium* spp. behandelt (infiltriert), z. B. durch Einreiben, Injektion oder Anwendung von Unterdruck. Agrobakterien sind in der Lage, T-DNA, die ein Transgen enthält, in Pflanzenzellen zu transferieren (Pitzksche und Hirt, 2010).

Man unterscheidet drei Typen der Agroinfiltration.

Agroinfiltration *sensu stricto*: Somatisches Gewebe, d. h. Gewebe, das keine Gameten enthält oder hervorbringt, wird mit Agrobakterien infiltriert. Ein nicht replikationsfähiges DNA-Segment mit dem Transgen wird in Zellen eingeschleust. Das Transgen wird in dem infiltrierten Gewebe exprimiert.

Agroinokulation/Agroinfektion: Somatisches Gewebe wird mit Agrobakterien infiltriert, in deren T-DNA ein viraler Vektor mit dem Transgen vorliegt. Dadurch wird eine erhöhte Expression des Transgens erreicht, die auch in benachbarten Zellen oder entfernten Geweben stattfinden kann.

Sowohl Agroinfiltration *sensu stricto* als auch Agroinokulation/Agroinfektion werden z. B. zur Produktion von bestimmten Proteinen in Pflanzen, zur vorübergehenden Genabschaltung (*gene silencing*) oder für die Untersuchung von Promotorwirkungen eingesetzt. Beide Techniken können zu einer stabilen Integration der rekombinanten T-DNA in das Genom der somatischen Zellen führen.

floral dip: Bei dieser Technik werden Gameten-bildende Organe (Blüte) durch Eintauchen in eine Agrobakterien-Suspension infiltriert, so dass T-DNA auch in Gameten und Embryonen

gelangt. Die eingeschleuste T-DNA kann stabil in das Empfänger-genom integrieren und chromosomal in den daraus entstehenden Pflanzen vorliegen. Diese Technik wird weithin zur Erzeugung stabil transformierter Blütenpflanzen angewandt.

Schlussfolgerung und Bewertung

Agroinfiltration *sensu stricto* und Agroinokulation/Agroinfektion

- Bei diesen beiden Techniken wird T-DNA auf somatische Empfängerzellen übertragen. Die T-DNA bzw. die daraus resultierenden Produkte sind lokal (nicht replikatives Konstrukt) oder systemisch (viraler Vektor) anwesend. Bei der infiltrierten Pflanze handelt es sich gemäß § 3 Nr. 3 GenTG nicht um einen GVO. Allerdings enthält die infiltrierte Pflanze GVO (Agrobakterien, ggf. Viren). Im Falle von Samen-übertragbaren Viren kann der Samen GVO enthalten. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Art. 2 RL 2001/18/EG bzw. Art. 2 RL 2009/41/EG.
- Die bei diesen beiden Techniken übertragene T-DNA kann in das Genom der somatischen Empfängerzellen integrieren. Die ZKBS wertet mehrzellige Organismen, bei denen rekombinante DNA in Teilen des somatischen Gewebes, nicht jedoch in reproduktivem Gewebe und Keimbahnzellen chromosomal vorliegt, nicht als GVO, weil die rekombinante DNA nicht an Nachkommen weitergegeben werden kann (ZKBS, 2011).

floral dip

- Bei der Anwendung der *floral dip*-Methode werden auch Gameten bzw. Embryonen infiltriert, so dass T-DNA stabil in das Genom von Gameten und von reproduktiven Zellen integrieren kann. Somit kann die rekombinante T-DNA an Folgegenerationen vererbt werden. Bei dem resultierenden Organismus handelt es sich gemäß § 3 Nr. 3 GenTG um einen GVO. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Art. 2 RL 2001/18/EG bzw. Art. 2 RL 2009/41/EG.

Die hier vorgenommenen Bewertungen der Pflanzen, die bei Agroinfiltration *sensu stricto*, Agroinokulation/Agroinfektion und *floral dip* entstehen, stimmen mit den Bewertungen durch die NTWG überein. Die ZKBS bewertet allerdings eine infiltrierte Pflanze, die einzelne transformierte somatische Zellen enthalten kann, nicht als GVO; zu diesem Punkt gibt es keine eindeutige Bewertung durch die NTWG.

IV.6 RNA-abhängige DNA-Methylierung (RaDM)

Technik

Mittels der RaDM-Technik ist es möglich, die Expression bestimmter Gene abzuschalten, ohne dass dabei die Nukleotidsequenz des Organismus verändert wird. Die Technik beruht auf der gezielten Methylierung des zugehörigen Promotors, der dadurch inaktiv wird (Suzuki et al., 2005; Kanazawa et al., 2011). Die gezielte Methylierung wird durch *small interfering* RNA (siRNA) oder microRNA (miRNA), die Sequenzübereinstimmung mit dem Promotor haben, ausgelöst. An diesem Vorgang sind mehrere Komponenten der natürlichen RNA-basierten Regulationsprozesse der Zelle beteiligt (Molnar et al., 2011). Das DNA-Methylierungsmuster wird dank spezieller Erhaltungs-Methyltransferasen aufrechterhalten und auf Nachkommen weitergegeben. So kann die Promotorinaktivierung (epigenetischer Effekt) in der aus der Zelle regenerierten Pflanze fortbestehen und auch über mehrere Generationen vererbt werden, geht aber eventuell irgendwann wieder verloren.

Die erforderliche siRNA oder miRNA kann in der Zelle auf verschiedenen Wegen bereitgestellt werden, z. B.:

- Die RNA kann durch Transfer einer rekombinanten DNA mit einem Gen für die erforderliche RNA in die Zelle eingebracht und dort chromosomal integriert werden.
- Die RNA kann durch Transfer einer rekombinanten DNA mit einem Gen für die RNA, die nur vorübergehend in der Zelle anwesend ist und exprimiert wird, eingebracht werden. Diese Zelle ist ein intermediärer Organismus Typ B. In Nachkommen dieses Organismus verbleibt lediglich die durch dieses Verfahren hervorgerufene epigenetische Veränderung.
- Isolierte RNA kann direkt in die Zelle eingebracht werden.

Schlussfolgerung und Bewertung

- Wird zur Generierung von siRNA oder miRNA rekombinante DNA stabil in das Empfängergenom integriert, liegt eine gentechnische Veränderung des Organismus vor.
Bei dem Organismus handelt es sich gemäß § 3 Nr. 3a. Buchst. a GenTG um einen GVO. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Anhang I A Teil 1 Nr. 1 RL 2001/18/EG bzw. Anhang I Teil A Nr. 1 RL 2009/41/EG.
- Liegt die rekombinante DNA nur vorübergehend vor, ist sie nur in dem intermediären Organismus, nicht aber in dessen Nachkommen, anwesend.
Der intermediäre Organismus ist gemäß § 3 Nr. 3a. Buchst. a GenTG ein GVO. Gemäß Anhang I A Teil 1 Nr. 1 RL 2001/18/EG und gemäß Anhang I Teil A Nr. 1 RL 2009/41/EG handelt es sich nicht um einen GVO.
Nachkommen des intermediären Organismus, die nachweislich die rekombinante DNA nicht enthalten und lediglich die epigenetische Veränderung aufweisen, sind nicht als GVO zu werten, da sie sich nicht genetisch vom Ausgangsorganismus unterscheiden (§ 3 Nr. 3 GenTG und auch Art. 2 RL 2001/18/EG und Art. 2 RL 2009/41/EG).
- Wird in der Zelle siRNA bzw. miRNA durch Einbringen von isolierter RNA bereitgestellt, wird kein Erbgut in die Zelle gebracht. RNA ist für Zellen kein genetisches Material.
Gemäß § 3 Nr. 3a. Buchst. b GenTG ist der Organismus kein GVO. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Anhang I A Teil 1 Nr. 2 RL 2001/18/EG bzw. Anhang I Teil A Nr. 2 RL 2009/41/EG.

Die hier vorgenommene Bewertung der mit der RaDM erzeugten Organismen stimmt mit der Bewertung durch die NTWG überein.

IV.7 Reverse Züchtung

Technik

Mit der Reversen Züchtung kann eine bestimmte F1-Hybride relativ leicht und in beliebiger Menge produziert werden (Dirks et al., 2009). Saatgut für F1-Hybride ist für die Nutzung des Heterosiseffektes agronomisch bedeutsam. Die Reverse Züchtung erzeugt aus einer ausgewählten Hybride mit den gewünschten Eigenschaften über mehrere Schritte zwei Parentalpflanzen, bei deren Kreuzung dann ausschließlich die unveränderten Hybriden entstehen (Wijnker et al., 2012). Zunächst werden in einem ersten Schritt Zellen der F1-Hybride (Ausgangsorganismus) über die stabile chromosomale Integration eines RNAi-Konstruktes transformiert, um durch Stilllegung eines der notwendigen Gene (z. B. *SPO11* oder *DCM1*) die meiotische Rekombination zu blockieren. Aus den transformierten Zellen werden eine Reihe transformierter Linien regeneriert, die das RNAi-Konstrukt entweder in unterschiedlichen Chromosomen oder in unterschiedlichen Homologen eines Chromosomsenpaares tragen (es entstehen intermediäre Organismen vom Typ A). Eine Suppression der meiotischen Rekombination kann auch über das Einbringen von vorübergehend anwesenden siRNA- oder miRNA-produzierenden Vektoren erreicht werden (es entstehen intermediäre Organismen vom Typ B). Von diesen Pflanzen werden Gameten (haploid) gebildet, deren Chromosomen nicht durch *crossover* verändert sind. In Gameten

des intermediären Organismus lässt sich durch konventionelle züchterische Verfahren eine Genomverdopplung induzieren. Daraus resultieren Pflanzen, die das haploide Genom doppelt besitzen (sogenannte "verdoppelte Haploide"; 2. Schritt). Zuletzt werden zwei der "verdoppelten Haploid-Pflanzen", die sich hinsichtlich ihrer Chromosomen zur gewünschten Ausgangshybride ergänzen und die zugleich kein RNAi-Konstrukt tragen, ausgewählt (3. Schritt; resultierende Organismen). Sie sind die gewünschten homozygoten Parentallinien zur Erzeugung der Hybride und können durch Selbstung reproduziert werden.

Schlussfolgerung und Bewertung

Schritt 1 der Technik

- Wird zur Suppression der meiotischen Rekombination eine rekombinante DNA stabil in das Genom des Ausgangsorganismus integriert, entsteht ein intermediärer Organismus Typ A mit einer vererbaren gentechnischen Veränderung.
Bei dem entstehenden Organismus handelt es sich gemäß § 3 Nr. 3 GenTG um einen GVO. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Art. 2 RL 2001/18/EG bzw. Art. 2 RL 2009/41/EG.
- Werden für die Unterdrückung der meiotischen Rekombination rekombinante Nukleinsäuren verwendet, die nur vorübergehend anwesend sind, entsteht ein intermediärer Organismus Typ B.
Der intermediäre Organismus ist gemäß § 3 Nr. 3a. lit. a GenTG ein GVO. Gemäß Anhang I A Teil 1 Nr. 1 RL 2001/18/EG bzw. gemäß Anhang I Teil A Nr. 1 RL 2009/41/EG handelt es sich nicht um einen GVO.

Schritt 2 der Technik

- Die Generierung von verdoppelten Hapliden basiert auf Techniken, die standardmäßig in der konventionellen Züchtung angewendet werden; es wird kein gentechnisches Verfahren bei diesen Techniken verwendet.
Bei den entstehenden Organismen handelt es sich gemäß § 3 Nr. 3a. GenTG nicht um GVO. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Anhang I A Teil 1 RL 2001/18/EG bzw. Anhang I Teil A RL 2009/41/EG. Wenn diese Technik auf GVO angewendet wird, dann bleiben sie GVO gemäß § 3 Nr. 3 GenTG.

Schritt 3 der Technik

- Die resultierenden Organismen der Reversen Züchtung sind nachweislich frei von rekombinanten Nukleinsäuren aus vorangegangenen Schritten.
Bei den resultierenden Organismen handelt es sich gemäß § 3 Nr. 3 GenTG nicht um GVO. Die gleiche Bewertung ergibt sich gemäß Art. 2 RL 2001/18/EG bzw. Art. 2 RL 2009/41/EG.

Die hier vorgenommene Bewertung der Technik der Reversen Züchtung und der aus ihr resultierenden Organismen stimmt mit der Bewertung durch die NTWG überein.

V. Zitierte Literatur

- Cao J, Schneeberger K, Ossowski S et al. (2011) Whole-genome sequencing of multiple *Arabidopsis thaliana* populations, *Nature Genetics*, 43, 10, 956-963
- Christian M, Cermak T, Doyle EL et al. (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases, *Genetics*, 186, 757-761
- Dirks R, van Dun K, de Snoo B et al. (2009) Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis, *Plant Biotechnology Journal*, 7, 837-845
- Eberbach, Lange, Ronellenfisch Ausschussbegründung zum Zweiten GenTG-Änderungsgesetz vom 16.08.2002, abgedruckt unter Eberbach/Lange/Ronellenfisch, Recht der Gentechnik und Biomedizin, § 3 Rn. 46f

- Furner IJ, Huffman GA, Amasino RM et al. (1986) An agrobacterium transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*, *Nature*, 319, 422-427
- Ghanem ME, Albacete A, Smigocki AC et al. (2011) Root-synthesized cytokinins improve shoot growth and fruit yield in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants, *Journal of Experimental Botany*, 62, 125-140
- Grizot S, Epinat J, Thomas S et al. (2010) Generation of redesigned homing endonucleases comprising DNA-binding domains derived from two different scaffolds, *Nucleic Acids Research*, 38, 6, 2006–2018
- Jacobsen E, Schouten HJ (2007) Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants, *Trends in Biotechnology*, 25, 219-223
- Kanazawa A, Inaba J, Kasai M et al. (2011) RNA-mediated epigenetic modifications of an endogenous gene targeted by a viral vector – a potent gene silencing system to produce a plant that does not carry a transgene but has altered traits, *Plant Signaling & Behavior*, 6, 8, 1090-1093
- Laible G, Wagner S, Alderson J (2006) Oligonucleotide-mediated gene modification and its promise for animal agriculture, *Gene*, 366, 17-26
- Molnar A, Melnyk CW, Bassett A et al. (2010) Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells, *Science*, 328, 5980, 872-875
- Molnar A, Melnyk CW, Baulcombe DC (2011) Silencing signals in plants: a long journey for small RNAs, *Genome Biology*, 12, 215
- New techniques working group (2012) Final Report
- Pitzschke A, Hirt H (2010) New insights into an old story: agrobacterium-induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal*, 29, 1021-1032
- Rommens CM (2007) Intragenic crop improvement: combining the benefits of traditional breeding and genetic engineering, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4281-4288
- Shaharuddin NA, Yuanhuai H, Hongying L et al. (2006) The mechanism of graft transmission of sense and antisense gene silencing in tomato plants, *FEBS Letters*, 580, 6579–6586
- Simon P, Cannata F, Concordet JP et al. (2008) Targeting DNA with triplex-forming oligonucleotides to modify gene sequence, *Biochimie*, 90, 1109-1116
- Stegemann S und Bock R (2009) Exchange of genetic material between cells in plant tissue grafts, *Science*, 324, 649–651
- Storici F (2008) RNA-mediated DNA modifications and RNA-templated DNA repair, *Current Opinion in Molecular Therapy*, 10, 224-230
- Suzuki K, Yamashita I, Tanaka N (2002) Tobacco plants were transformed by *Agrobacterium rhizogenes* infection during their evolution, *The Plant Journal*, 32,775-787
- Suzuki K, Shijuuku T, Fukamachi T et al. (2005) Prolonged transcriptional silencing and CpG methylation induced by siRNAs targeted to the HIV-1 promoter region, *Journal of RNAi and Gene Silencing*, 1, 2, 66-78
- Wijnker E, van Dun K, de Snoo B et al. (2012) Reverse breeding in *Arabidopsis thaliana* generates homozygous parental lines from a heterozygous plant, *Nature Genetics*, doi: 10.1038/ng.2203
- ZKBS (geänderte Fassung vom November 2011) Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Gentransfer mit Hilfe retroviraler Vektoren (Az. 6790-10-41)