

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences**

Anwendung von CRISPR/Cas bei landwirtschaftlichen Nutzpflanzen und
Obstkulturen am Beispiel von Kartoffeln und Tomaten

Masterarbeit

im Studiengang Food Science (M.Sc.)

vorgelegt von

Laura Katharina Beer

Abgabeort: Hamburg
am 16. August 2023

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Stefan Lunkenbein

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Julien Béthune

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1. Abstract/Zusammenfassung	1
2. Einleitung	4
3. Theoretischer Hintergrund	8
3.1. Übersicht von bestehenden Züchtungsverfahren	8
3.2. Methoden der Pflanzenzucht	9
3.2.1. Selektionszüchtung	9
3.2.2. Kombinationszüchtung	9
3.2.3. Klonzüchtung.....	10
3.2.4. Hybridzüchtung	10
3.2.5. Induzierte, ungerichtete Mutationszüchtung.....	11
3.3. Übersicht Unterteilung von Mutationen	11
3.4. (Grüne) Gentechnik	12
3.4.1. Transformation durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
3.4.2. Weitere Gentechnische Methoden	13
3.5. Biologisches Hintergrundwissen	14
3.5.1. Vorwissen zu molekularen Scheren	14
3.5.2. Genome Editing (Genom-Editierung).....	15
3.6. Timeline CRISPR/Cas9.....	16
3.7. Bakteriell CRISPR/Cas-System	18
3.7.1. Struktur des CRISPR/Cas-Systems	18
3.7.2. Prinzip Adaptives Immunsystem	20
3.8. Biotechnologische Anwendung von CRISPR/Cas in der Pflanzenzucht	22
3.8.1. Methoden zum Einbringen des CRISPR/Cas-Systems in die Pflanze	23
3.8.2. Reparaturmechanismen	25
3.9. Herstellungsanleitung eines synthetischen CRISPR/Cas-Komplexes	27
3.9.1. Beispiel CRISPR/Cas Integration in eine Tomatenpflanze	30
3.10. Lebensmittelbezogene Schlüsselbegriffe	32
3.10.1. Landwirtschaftliche Nutzpflanzen.....	32
3.10.2. Obstkulturen	32
3.10.3. Kartoffel	32
3.10.4. Tomate	33

4. Methoden	35
4.1. Methode 1: Systematische Literaturrecherche	35
4.1.1. Suchstrategie	35
4.1.2. Auswertungsstrategie.....	37
4.2. Methode 2: Experteninterviews.....	37
4.2.1. Das Leitfadengestützte Experteninterview	37
4.2.2. Auswahl der Experten	38
4.2.3. Vorbereitung-Entwicklung des Interviewleitfadens.....	39
4.2.4. Interviewdurchführung.....	39
4.2.5. Methode zur Auswertung der Experteninterviews.....	40
5. Ergebnisse	43
5.1. Literaturübersicht	43
5.1.1. Ergebnisse der Auswertungsstrategie der Literaturrecherche	43
5.1.2. Anwendungsbeispiel Kartoffel	45
5.1.3. Anwendungsbeispiel Tomate	51
5.2. Erkenntnisse aus Experteninterviews	64
5.2.1. Ergebnisse der Auswertungsstrategie der Interviews	64
5.2.2. Aktueller Stand und zukünftige Bedeutung	64
5.2.3. Lebensmittelbezogene Anwendungsbeispiele	70
5.2.4. Lebensmittelsicherheit.....	76
5.2.5. Lebensmittelrechtliche Zuordnung	81
6. Diskussion	88
6.1. Methoden Diskussion.....	88
6.2. Ergebnis Zusammenfassung	88
6.3. Interpretation der Ergebnisse.....	92
6.4. Empfehlungen	104
6.5. Begrenzungen.....	105
6.6. Weiterführende Forschung und Zukunftsausblick.....	106
7. Schlussfolgerung	108
Literaturverzeichnis	111
Anhang	124
7.1. Anhang I - Theorie	124
7.2. Anhang II - Methoden	124
7.3. Anhang III - Ergebnisse	134
Eidesstattliche Erklärung	135

Abkürzungsverzeichnis

AS1	Asparagin Synthetase 1
AS-PCR	Allele-specific polimerase chain reaction
AtJAZ2	Arabidopsis Jasmonate ZIM-Domain Protein 2
Blc	Beta-Carotene hydroxylase
BLE	Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
8CM	acht-Cystein-Motiv
Cas9	CRISPR/associated
Cas12a	CRISPR-associated endonuclease in Prevotella and Francisella1
CAT9	cationic amino acid transporter
CCD8	Carotenoid Cleavage Dioxygenase 8
CIS	Cold-Induced Sweetening
COR	Coronatin
CP	Coat Protein
Cpf1	CRISPR-associated endonuclease in Prevotella and Francisella1
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic repeats
crRNA	crispr- ribonucleic acid
CYP78A	Cytochrom-(CY)-P78A
DDTFR10/A	ripening regulated protein DDTFR10/A
DNA	Deoxyribonucleic acid
EFSA	European Food Safety Authority
eIF4E1	Eukaryotic translation initiation factor E1
EREBP	Ethylen-Response-Element-Binding-Protein
EuGH	Europäischer Gerichtshof
FtsZ1	Filamentous Temperature-sensitive Z1
GABA	γ -Aminobuttersäure
GBSSL	Granule-Bound-Starch Synthase
GSTAA	Glutathione S-Transferase
gRNA	guide-ribonucleic acid
GVO	genetisch veränderte Organismen
GMO	genetically modified organism
HDR	homology direct repair
IPK	Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
LCY-B1	Lycopin beta cyclase 1
LCY-B2	Lycopin beta cyclase 2
LCY-E	Lycopene epsilon-cyclase

LEH	Lebensmitteleinzelhandel
MAX1	More Axillary Groth 1
mRNA	messenger-ribonucleic acid
miRNA	micro- ribonucleic acid
M9 SNP	M9 Single-Nukleotid-Polymorphismus
Ms1035	male sterile 1035
MYB12	Myeloblasstosis 12
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHEJ	non-homologous end joining-system
ODM	Oligonucleotide directed mutagenesis
On	<i>Oidium neolycopersici</i>
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PCR	Polimerase Chain Reaction
PepMoV	pepper mottle virus
PeSIVPE5	Solanum lycopersicum Vacuolar Processing Enzym 5
PPO	Polyphenoloxidasen
PtoDC3000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato
PVY	potato virus V
pre-crRNA	precursor-crispr- ribonucleic acid
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
qPCR	quantitative polimerase chain reaction
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNPs	Ribonucleoprotein complex
SDN	Site directed nucleases
PDS	tomato phytoene desaturase
PG2a	Polygalacturonase 2a
PRD	proline-rich-domain
PMR4	Powdery mildrew resistant 4
SGAs	Steroidglykoalkaloiden
sgRNA	single guide ribonucleic acid
SGR1	Stay-green 1
SGT1	Steroid Glycoalkaloid Biosynthetic 1
SIARF4	Auxin response Factor 4
SIACO	Solanum lycopersicum Acotinas
SIAN2	Solanum lycopersicum Anthocyaninless 2
SICMT4	Solanum lycopersicum

SIGAD3	Solanum lycopersicum γ -Aminobutyric Acid Translocator D3
SIHyPRP1	Solanum lycopersicum hybrid proline-rich protein 1
SIJAZ2	Solanum lycopersicum Jasmonate ZIM-DomainenProtein 2
SIKLUH	Solanum lycopersicum KLU Homolog-Promotor
SILBD40	Solanum lycopersicum LBD40
SICBF1	Solanum lycopersicum C-repeat Binding Factor 1
SIINVINH1	Solanum lycopersicum invertase inhibitor 1
SIMlo1	Mildew resistance locus o1
SIMYB3R3	Solanum lycopersicum MYB transcription factor 3 repressor 3
SIMYC2	Solanum lycopersicum MYC2
SINPR1	Solanum lycopersicum Nonexpressor of Pathogenesis-Related Gen 1
SIPelo	Solanum lycopersicum Pedicle Elongated locus
SIPHD_MS1	Solanum lycopersicum plant homeodomain protei MS1
SIPLC2	Solanum lycopersicum Phospholipase-C2
SISAMT	Salicylic acid methyl transferase
SIZIP1	Solanum lycopersicum basic Zipper 1
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SSADH	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase
StCHL1	Solanum tuberosum Chlorophyllase 1
StERF3	Solanum tuberosum Ethylene Response Factor 3
StDMR6-1	Solanum tuberosum Downy Mildew Resistance 6-1
StDnD1	Solanum tuberosum Disease Resistance Protein DND1
StPDS	Solanum tuberosum phytoene Desaturase
StPPO2	Solanum tuberosum Polyphenol Oxidase 2
StSSR2	Sterol side chain reductase 2
St16DOX	Stearoyl-ACP Desaturas
TALENs	Transcription-activator-like effector nucleases
TBG4	b-Galactanase
Ti-Plasmid	Tumor-induzierendes Plasmid
TP1-3	GABA-transaminase subunit precursor isoforme 1-3
tracrRNA	trans-activating crispr- ribonucleic acid
TYLCV	Tomato Yellow leaf curl virus
Vinv	Vacuolar Invertase
XSP10	Xylemsap protein
ZFNs	Zinkfinger-Nukleasen
ZKBS	Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Züchtungsverfahren in der Pflanzenzucht	8
Abbildung 2: Mutationen in der Pflanzenzucht	12
Abbildung 3: Bestandteile CRISPR/Cas modifiziert nach: Matissek und Fischer, 2021....	19
Abbildung 4: Adaption, modifiziert nach: Paris, 2023	20
Abbildung 5: Expression, modifiziert nach: Paris, 2023	21
Abbildung 7: Interferenz, modifiziert nach: Paris, 2023	22
Abbildung 8: Tomatenmutation durch CRISPR/Cas mit SICMT4.....	31
Abbildung 9: Ergebnisse der Auswertungsstrategie modifiziert nach: PRISMA.....	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aktueller Stand - Existierende Methoden	64
Tabelle 2: Aktueller Stand - Potenzialeinschätzung der Experten.....	65
Tabelle 3: Aktueller Stand - Gesellschaftliche Akzeptanz	66
Tabelle 4: Aktueller Stand - Klima	68
Tabelle 5: Aktueller Stand - Optimierte Pflanzeigenschaften	69
Tabelle 6: Anwendungsbeispiel - Kartoffel	70
Tabelle 7: Anwendungsbeispiel - Tomate	72
Tabelle 8: Anwendungsbeispiel - Vorteile	74
Tabelle 9: Anwendungsbeispiel - Direkter Verzehr oder weiterverarbeitete Produkte	75
Tabelle 10: Lebensmittelsicherheit - Allgemein	76
Tabelle 11: Lebensmittelsicherheit - Risiken	77
Tabelle 12: Lebensmittelsicherheit - Risikoprüfung	79
Tabelle 13: Lebensmittelsicherheit - Aufbauende Technologien	80
Tabelle 14: Lebensmittelrecht - Umgang mit Genome Edits außerhalb der EU.....	81
Tabelle 15: Lebensmittelrecht - Umgang mit Genome Edits innerhalb der EU	82
Tabelle 16: Lebensmittelrecht - Kennzeichnung	84
Tabelle 17: Lebensmittelrecht - Zulassung.....	85

1. Abstract/Zusammenfassung

CRISPR/Cas is a revolutionary gene editing technology in plant biology.

Continuous optimization allows faster and more precise genetic modification in the plant genome. In this piece of work, CRISPR/Cas applications for agricultural products such as *Solanum tuberosum* and *Solanum lycopersicum* are investigated. A systematic literature review as well as expert interviews were determined as research methods.

Properties of *S. tuberosum* and *S. lycopersicum*, plant traits could be successfully influenced by using CRISPR/Cas technology.

Improved taste and an enhanced nutritional value of *S. tuberosum* were achieved with a reduction of enzymatic browning by reducing PPO activity. Quality of *S. tuberosum* increased by preventing CIS, which resulted in a reduced acrylamide production. Plant architecture of *S. tuberosum* was regulated by engineered genes affecting carotenoid content. A reduction of toxic ingredients in *S. tuberosum* was achieved by a reduced α -solanine production. The starch properties of *S. tuberosum* were effected by removing the amylose component.

In *S. lycopersicum*, sugar content, carotenoids and tocopherols could be increased by adapted metabolic pathways. Improved shelf life of *S. lycopersicum* was achieved by gene editing of involved genes for pectin-degrading enzymes. In *S. lycopersicum*, color and fruit shape could be changed. *S. lycopersicum* also showed increased fruit ripening.

Pathogen resistance by silencing susceptibility genes was developed for both *S. tuberosum* and *S. lycopersicum* to pathogens, such as *P. infestans*, potyviruses, and powdery mildew. Many CRISPR/Cas applications have been identified for *S. lycopersicum*, that increase tolerance to abiotic stress.

The hazard potential of food produced by CRISPR/Cas are low according to experts. The development of a meaningful food regulatory basis that reflects the current state of knowledge is subject to cumbersome development.

CRISPR/Cas technology is a promising opportunity for innovative agriculture in the near future.

CRISPR/Cas gilt als revolutionäre Genschnitt-Technologie in der Pflanzenbiologie.

Eine kontinuierliche Optimierung erlaubt es schnellere und präzisere genetische Veränderungen im Pflanzengenom vorzunehmen. In dieser Arbeit werden Anwendungen von CRISPR/Cas für landwirtschaftliche Produkte, wie *Solanum tuberosum* und *Solanum lycopersicum* untersucht. Hierbei wurden eine systematische Literaturrecherche sowie Experteninterviews als Forschungsmethoden festgelegt.

In *S. tuberosum* und *S. lycopersicum* konnten Pflanzeigenschaften mit der CRISPR/Cas-Technologie erfolgreich beeinflusst werden.

Verbesserter Geschmack und ein erhöhter Nährwert von *S. tuberosum* wurden mit der Reduktion enzymatischer Bräunung durch eine verminderte PPO-Aktivität erreicht. Die Qualität von *S. tuberosum* steigt, indem CIS verhindert wurde, wodurch eine eingeschränkte Acrylamidproduktion erzielt werden konnte. Die Pflanzenarchitektur von *S. tuberosum* wurde von bearbeiteten Genen, die den Carotinoidgehalt beeinflussen, reguliert. Die Reduktion toxischer Inhaltsstoffe in *S. tuberosum* wurde im Detail durch eine verminderte α -Solanin-Produktion erreicht. Die Stärkeigenschaften von *S. tuberosum* konnten durch das Entfernen der Amylose-Komponente beeinflusst werden.

Bei *S. lycopersicum* konnte Zuckergehalt, Carotinoide und Tocopherole durch angepasste Stoffwechselwege erhöht werden. Die Haltbarkeit von *S. lycopersicum* wurde durch die Genbearbeitung beteiligter Gene für Pektin-abbauenden Enzymen erzielt. Bei *S. lycopersicum* wurde neben der Farbe, die Fruchtform verändert. Bei *S. lycopersicum* zeigte sich eine gesteigerte Fruchtreife. Für *S. lycopersicum* wurden zudem viele CRISPR/Cas-Anwendungen identifiziert, die zu einer erhöhten Toleranz gegenüber abiotischer Belastung beitragen.

Pathogenresistenzen durch das Ausschalten von Sensitivitätsgenen wurden sowohl für *S. tuberosum* als auch für *S. lycopersicum* gegenüber Erregern, wie *P. infestans*, Potyviren und Mehltau entwickelt.

Das Gefahrenpotenzial von Lebensmitteln, die durch die CRISPR/Cas-Technologie hergestellt wurden, wird von Experten als gering eingestuft. Die Erarbeitung einer aussagekräftigen, lebensmittelrechtlichen Grundlage, die dem aktuellen Wissensstand gerecht wird, unterliegt einer schwerfälligen Entwicklung.

Für die Zukunft verspricht die CRISPR/Cas-Technologie die Chance einer transformativen und innovativen Landwirtschaft.

2. Einleitung

Vor etwa 50 Jahren, zu dem Zeitpunkt als ein gesteigertes Bewusstsein für Lebensmittel in den Köpfen der Menschen entstand, wurde der Begriff: „Gentechnik“ erstmals verwendet und gentechnische Veränderungen an Viren durchgeführt (Mäntele, 2021, p. 139-141). Eine neue Ära in der Biologie, wurde durch die erste genetische Manipulation im Jahre 1972 ausgelöst (Buchholz and Collins, 2022 p. 244). Die neuartige Naturwissenschaft wird als Molekularbiologie bekannt. Der Fokus auf Pflanzen erfolgte weitere 10 Jahre später im Jahre 1983, in dem die nächste Lebensmittel bedingte Revolution durch genetisch veränderte Organismen (GVO) in der Landwirtschaft ausgelöst wurde (Qaim, 2020, p. 131-132)

Bei der ersten genetisch veränderten Pflanze handelte es sich um eine Tabaklinie. Ein Gen des *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) und somit Fremd-DNA, wurde in die Tabakpflanze eingeschleust (Wünschiers, 2019a, p. 63).

Für die Pflanzenforschung stellt das Jahr 1994 aufgrund des Markteintritts der ersten kommerziell vertriebenen genetisch veränderten Pflanze (Tomate), einen weiteren Meilenstein dar. Ihre Bezeichnung lautet: „Flavr Savr“ (Flavor saver, eng. für „Geschmacksretter“). Der natürliche Verderb der Tomatenpflanze sollte verlangsamt werden, um die Tomate reif ernten- und reif in Verkehr bringen zu können (Kadereit et al., 2021, p.15).

Genome Editing ist der nächste Schritt, der die herkömmliche Gentechnik ablöst. Sie schließt zukunftsweisende Technologien ein, die DNA-Abschnitte in das Pflanzengenom gezielt einfügen, austauschen oder entfernen können und damit eine effektivere Pflanzenzüchtung ermöglichen (Schmidt, 2017, p. 267). Gegenstand der vorliegenden Untersuchung ist eine Technologie, die zu den Genome Editing Verfahren zählt und CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated Proteine) heißt. CRISPR/Cas9 ist das produktivste Verfahren der Genom-Editierung und hat aufgrund ihrer praktischen Anwendungsmöglichkeiten und Effizienz große Aufmerksamkeit erlangt (Ezura, 2022, p. 731-733).

Die Anwendung von CRISPR/Cas verringert bekannte Schwierigkeiten, wie die bei der Züchtung auftretende Zufälligkeit von Mutationen. Sie bietet vielversprechende Möglichkeiten, qualitativ hochwertige und ertragreiche Pflanzen zu generieren, die zu einer nachhaltigen und globalen Nahrungsmittelproduktion beitragen (Clemens, 2021, p. 341). Wichtige Nahrungspflanzen können an Umweltbelastungen angepasst und die Ernährungssicherheit optimaler gestaltet werden. Die Technologie stellt eine herausragende Bedeutung und eine

der größten Chancen für die zukünftige Pflanzenforschung und die Landwirtschaft dar (Knott & Doudna, 2018, p. 866-869).

In dieser Masterarbeit wird der Mechanismus des CRISPR/Cas-Systems sowie dessen Anwendung und Optimierung auf landwirtschaftliche Produkte am Beispiel von *Solanum lycopersicum* und *Solanum tuberosum* untersucht.

Obst und Gemüse stellen Grundnahrungsmittel aus landwirtschaftlicher Erzeugung dar und nehmen weltweit eine bedeutende, ernährungsphysiologische Relevanz ein. Der Bedarf an ertragreicheren Obstkulturen sowie Wurzelgemüse (Knollengemüse), die effektiver an die Umwelt angepasst sind, nimmt stetig zu.

Die Kartoffel (*Solanum tuberosum*) spielt eine entscheidende Rolle für die Nahrungsversorgung. Ihr Hauptbestandteil, die Stärke, ist sowohl für Lebensmittel als auch für die Modifikation der Stärkezusammensetzung entscheidend und eröffnet erhebliche Chancen auf verschiedenen Industriezweigen (Andersson et al., 2017, p. 117-118).

Die Tomate (*Solanum lycopersicum*) stellt eine der kommerziell wichtigsten und wertvollsten Obstpflanzen weltweit dar. Sie bietet eine wichtige Quelle an Vitaminen, Mineralien und sekundären Pflanzenstoffen für die menschliche Ernährung. Sie hat großes Potenzial in unterschiedlichen Modifikationen durch CRISPR/Cas erfolgreich zu sein (Nagamine et al., 2023, p. 1).

Für die Lebensmittelindustrie stellen zuverlässig verfügbare Rohstoffe aus der Primärproduktion einen wichtigen Faktor dar und sind für die Weiterverarbeitung zu unterschiedlichsten Produkten unerlässlich. Der Lebensmittel- und Agrarsektor muss Produkte bereitstellen, die hohen Anforderungen gerecht werden. Die Aufrechterhaltung der allgemeinen Pflanzengesundheit und auch sekundär- die Bereitstellung von absatzstarken Produkteigenschaften sind Herausforderungen, denen sich gestellt werden muss (Yadav, 2020, p. 475-479).

Durch die Auseinandersetzung mit der CRISPR/Cas-Technologie sollen bestehende Lösungsansätze in der Pflanzenzüchtung vorgestellt und die Anwendungsfelder aus unterschiedlichen Interessensabsichten beleuchtet werden. Den Leser:Innen soll ein umfassender und wissenschaftlich fundierter Überblick über die mit der Technologie zusammenhängenden biotechnologischen Prozesse sowie dem Forschungsstand vermittelt werden.

Mittlerweile gibt es viele verschiedene CRISPR/Cas-Systeme mit unterschiedlichen Cas-Endonukleasen. In der Arbeit wird verallgemeinernd, explizite Studienergebnisse

ausgenommen, vorzugsweise von CRISPR/Cas gesprochen, um keines der Proteine auszuschließen. Das am häufigsten verwendete Enzym ist Cas9, das aus *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) stammt (J. Kurreck et al., 2022, p. 1008).

Fragestellung

Welche züchterisch zugrundeliegenden Anwendungsbereiche werden mit der CRISPR/Cas Technologie bei Kartoffeln und Tomaten aktuell abgedeckt? Wie ist der gegenwärtige Status und welche Bedeutung wird die Technologie für landwirtschaftliche Nutzpflanzen und Obstkulturen zukünftig einnehmen?

Der erste Teil der Fragestellung bezieht sich auf die Literaturübersicht. Im Detail werden hier (globale) Anwendungen anhand der Lebensmittelbeispiele Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und Tomate (*Solanum Lycopersicum*) aufgezeigt. Die Forschung darf außerhalb der EU deutlich anwendungsbezogener betrieben werden. Der zweite Teil der Fragestellung wird anhand der Experteninterviews beantwortet. Hierbei werden Gesichtspunkte, wie Lebensmittelsicherheit und Lebensmittelrecht hinsichtlich einer Zulassung in der Europäischen Union mit eingebunden.

Aufbauend auf der Risiko- sowie der lebensmittelrechtlichen Bewertung der Experten werden Handlungsempfehlungen (Diskussion) erarbeitet, die aus aktueller Forschung (Literatur) und Interviews resultieren. Hieraus ergäbe sich eine Argumentationsgrundlage für eine mögliche Zulassung von CRISPR/Cas Produkten in der EU. Im Folgenden werden drei Hypothesen präsentiert, die untersucht werden sollen.

Hypothese: Die Landwirtschaft, die Lebensmittelindustrie sowie Verbraucher:Innen profitieren erheblich von veränderten Pflanzeigenschaften, die durch CRISPR/Cas erzeugt werden. Die Beispiele Kartoffel und Tomate veranschaulichen dies besonders gut und eignen sich daher, relevante, züchterische Eigenschaften zu verdeutlichen.

Hypothese: Die Anwendung von CRISPR/Cas kann bei landwirtschaftlichen Nutzpflanzen und Obstkulturen für Mensch, Tier, Umwelt und Natur bedenkenlos in Europa eingesetzt werden. Es besteht kein Risiko für die Freisetzung sowie das Inverkehrbringen.

Hypothese: Organismen, die durch CRISPR/Cas verändert werden haben denselben, wenn nicht mehr Anspruch auf eine Befreiung der Gentechnik-Regulierung als Organismen, die durch ungerichtete Mutagenese entstanden sind.

Die Methodik umfasst eine klassische, systematische Literaturrecherche zu den Anwendungsbereichen von CRISPR/Cas in der Pflanzenzüchtung. Die Experteninterviews stellen den Forschungsanteil dar. Gemeinsam dienen beide Methoden dazu, die aufgestellten Hypothesen der hier behandelten Forschung zu überprüfen.

3. Theoretischer Hintergrund

Der Theorieteil beginnt mit der übergreifenden Themeneinführung in züchterische Verfahrenstechniken. Die Entwicklung des Erfolges einer Züchtung angefangenen von der konventionellen Züchtung sowie der konventionellen Gentechnik bis zur Anwendung von Genome Editing-Verfahren, wie CRISPR/Cas, soll übersichtlich dargestellt werden. Es soll deutlich werden, wie die Methoden voneinander abgegrenzt werden und welche Elemente sich überschneiden.

Im nächsten Schritt wird das biologische Basiswissen, technische Grundlagen sowie einzelne Schlüsselbegriffe, die für das Verständnis und für die Bearbeitung des Forschungsthemas notwendig sind, um editierte Kartoffel- und Tomatenlinien mit CRISPR/Cas erfolgreich generieren zu können, vorgestellt.

3.1. Übersicht von bestehenden Züchtungsverfahren

Folgende Übersicht fasst die Methoden der existierenden Züchtungsverfahren gemäß der europäischen Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG zusammen. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf den rechten Bereich, der gentechnischen Verfahren, worunter aktuell Genome Editing und somit die CRISPR/Cas-Technologie fällt und entsprechend reguliert ist.

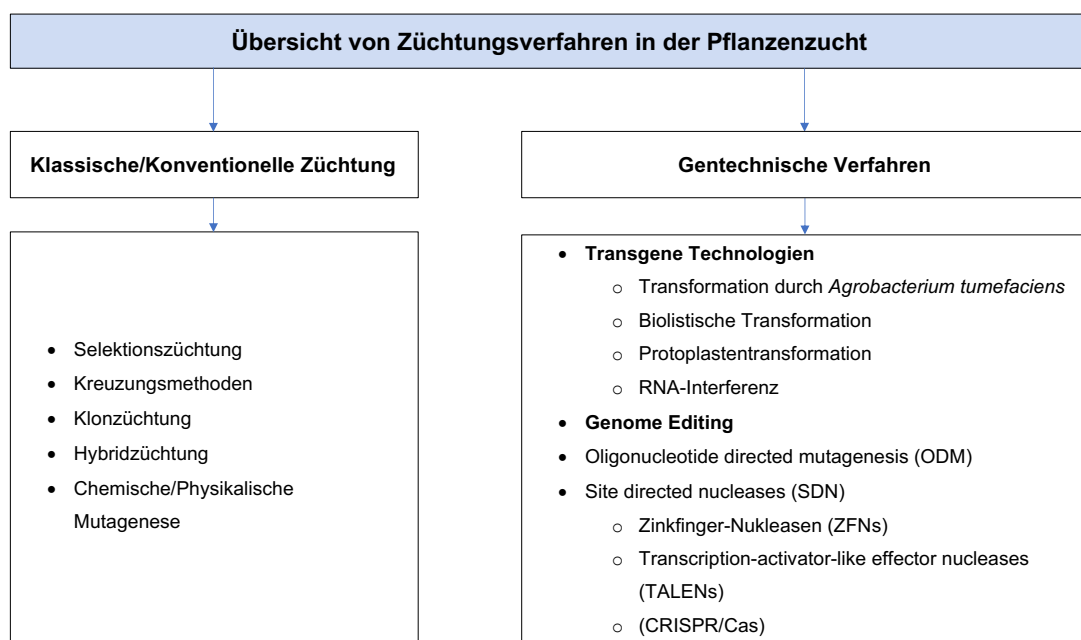


Abbildung 1: Züchtungsverfahren in der Pflanzenzucht

3.2. Methoden der Pflanzenzucht

Das folgende Kapitel ist den bestehenden konventionellen Züchtungsmethoden gewidmet. Die wichtigsten Techniken werden benannt und mit den wesentlichen Merkmalen beschrieben.

3.2.1. Selektionszüchtung

Die älteste Vorgehensweise, um Pflanzenzüchtung zu betreiben, stellt die gezielte Selektionszüchtung dar. Pflanzen mit gewünschten Eigenschaften aus der F1-Generation von zuvor gemeinsam angebauten Pflanzen, die sich auf natürlichem Wege fortgepflanzt haben (natürliche Rekombination), werden selektiert und wiederholt angebaut bis das Zuchtziel erwirkt wird (Brunner et al., 2019, p.7). Neue Linien oder Sorten können somit aus einer Population entwickelt werden, indem sich die Selektion auf unterschiedliche Merkmale innerhalb einer Population konzentriert. Selektion beschreibt den gezielten Prozess, die genetische Vielfalt innerhalb einer bestehenden Population zu nutzen, um positive Pflanzenmerkmale mit gewünschten Eigenschaften zu erhalten. Die Durchführung von Selektion basiert auf Beobachtung, Messung und Auswertung von Pflanzenmerkmalen. Steigernde Erträge, verbesserte Qualitätskriterien, eine hohe Umwelttoleranz, eine zuverlässige Lagerstabilität sowie dem Erreichen von Resistenzen hatten schon vor Jahrhunderten einen hohen Stellenwert. Domestizierte Nutzpflanzen mit diesen gewünschten Eigenschaften gleichen der ursprünglichen Wildform kaum (Kellermann, 2020, p. 15).

3.2.2. Kombinationszüchtung

Die auf der Selektionszüchtung aufbauende Zuchtform heißt Kombinationszüchtung. Es werden gezielt Kreuzungen von zwei oder mehreren Pflanzen, die genetisch unterschiedlich sind, jedoch derselben Art angehören, miteinander gepaart. Es sollen neue Variationen und Genkombinationen erzeugt werden, indem die gewünschten Merkmale beider Eltern kombiniert und in der Nachkommenschaft intensiviert werden. Die Genpools verschmelzen und es entstehen verschiedene Saatgut-Sortentypen, die nach Art des Vermehrungsprozesses (Fremd-/ Selbstbefruchtung oder vegetative Vermehrung) eingeteilt sind. Daraus ergeben sich vier unterschiedlich zu unterteilende Kreuzungszuchtmethoden, von denen zwei zu der Kombinationszüchtung zählen:

Linienzüchtung:

Hierbei wird die Fortpflanzung reinerbiger Pflanzen gefördert. Das Zuchtziel wird, durch Selektion über mehrere Generationen erreicht. Linienzüchtung bringt homozygote Pflanzen

hervor, erfolgt über den Vermehrungsprozess: Selbstbefruchtung und fällt unter den Sortentyp: Liniensorte.

Populationszüchtung:

Die Populationszüchtung bringt Populationssorten (Sortentyp) hervor und erfolgt über den Vermehrungsprozess: Fremdbefruchtung. Um neuartige Pflanzeigenschaften zu erhalten, wird die Fortpflanzung mischerbiger Pflanzen gefördert. Somit werden überwiegend heterozygote Pflanzen generiert (Kellermann, 2020, p.16-17).

3.2.3. Klonzüchtung

Für die nichtgeschlechtliche, vegetative Vermehrung in der Klonzüchtung sind im Vorfeld zwei Elternpflanzen geschlechtlich zu vermehren. Aus den Nachkommen der geschlechtlich vermehrten Pflanzen entstehen anschließend mit Hilfe von Gewebekulturen, Knollen oder Stecklingen nicht geschlechtlich vermehrte Klone, die erneut in weiteren Selektionsschritten dem Zuchtziel angepasst werden (Heberer, 2021, p. 7).

Bei jeder vorgestellten Zuchtmethode wird das Erbgut der Pflanzen durch Kreuzung vollständig miteinander vermischt. Es entstehen Pflanzen mit neuen Merkmalskombinationen, von denen negative Eigenschaften durch Rückkreuzung entfernt werden müssen, um Sorten mit hoher Homogenität zu schaffen. Um eine Inzuchtdepression zu verhindern, ist eine erhöhte Heterogenität ausschließlich bei Populationssorten erforderlich (Kellermann, 2020, p.19).

3.2.4. Hybridzüchtung

Zwei homozygote, sich deutlich voneinander unterscheidende Inzuchtlinien, werden gepaart. Die heterozygoten Nachkommen der F1-Generation besitzen dieselben Eigenschaften, wie die Elterngeneration, produzieren jedoch deutlich leistungsfähigere und ertragreichere Nachkommen. Dieser Effekt ergibt sich ausschließlich bei der ersten Generation von Nachkommen (Heberer, 2021, p. 7), weshalb neue Hybride immer durch eine erneute Kreuzung der Elternpflanzen erzeugt werden müssen. Es ist wichtig, dass eine Selbstbefruchtung mit dem eigenen Pollen bei der Erzeugung von Hybridpflanzen ausbleibt, um die genetische Vielfalt zu bewahren. Dies wird mit Chemischer Kastration durchgeführt, wobei bisher keine chemische Substanz vollkommene männliche Sterilität herbeiführt (Kellermann, 2020, p. 18).

Die bisher vorgestellten Zuchtmethoden sind auf Merkmale begrenzt, die in den Pflanzenarten bereits vorliegen. Deren Allele können beliebig miteinander rekombiniert werden, allerdings gerät die klassische Züchtung an ihre Grenzen sofern das gewünschte züchterische Merkmal nicht in den vorliegenden Pflanzenarten auftritt (Kellermann, 2020, p. 22).

3.2.5. Induzierte, ungerichtete Mutationszüchtung

Die Mutationszüchtung wurde entwickelt, um neue Mutationen im Pflanzengenom zu induzieren, die neue und bisher nicht vorhandene Eigenschaften mit unterschiedlichen Merkmalsausprägungen exprimieren und gleichzeitig für eine erhöhte genetische Variation sorgen. Natürliche Mutationen, die spontan beispielsweise durch die UV-Strahlung der Sonne auftreten, sind in der Natur verbreitet. Züchter sind jedoch in der Lage die Mutationsanzahl durch entsprechende chemische Agenzien oder durch physikalische Bestrahlung in hohem Ausmaß zu steigern. Röntgenstrahlung und Neutronen haben sich für die Bestrahlung bewährt. Besonders häufig wird die Chemikalie Ethylmethansulfonat verwendet, um Mutationen im Pflanzengenom hervorzurufen. Es kommt zu ungerichteten und somit zu willkürlichen Mutationen an unterschiedlichen Stellen im Genom, bei denen sich auch negative Veränderungen ausbilden könnten. Demnach sind viele Rückkreuzungen und eine sorgfältige Selektion erforderlich, um unerwünschte Mutationen aus dem veränderten Pflanzengenom ausschließen zu können. Die Selektion erfolgt in der Regel über den Phänotyp. Viele Mutationen bleiben somit unbemerkt. Das Ausmaß der stattfindenden Mutationen ist ebenfalls nicht kontrollierbar. Es können von einzelnen Genen bis hin zu großen Genblöcken genetische Veränderungen vorgenommen werden. So kann ebenfalls auf die Anzahl der Chromosomenanzahl Einfluss genommen werden. Die durch ungerichtete Mutagenese entstandenen Pflanzen sind trotz des veränderten Pflanzengenoms durch technische Einwirkungen, von der Gentechnik-Regulierung ausgenommen und gesetzlich mit konventionellen Züchtungsverfahren gleichgestellt. In Europa angebaute Kulturpflanzen, entstehen zu großen Teilen durch ungerichtete Mutationszüchtung. Bei einigen Sorten ist die Zucht durch Mutation schwierig zu umgehen, wenn zum Beispiel eine Sorte in allen Eigenschaften erhalten bleiben und nur wenige Gene eine Veränderung erfahren sollen (Kellermann, 2020, p. 20).

3.3. Übersicht Unterteilung von Mutationen

Im weiteren Verlauf wird der Fokus zunehmend auf gerichtete Mutationen gelegt, da es sich bei der CRISPR/Cas-Technologie um das Herbeiführen spezifischer Punktmutationen handelt. Folgende Übersicht bietet einen Überblick über angewandte Mutationstypen in Pflanzen.

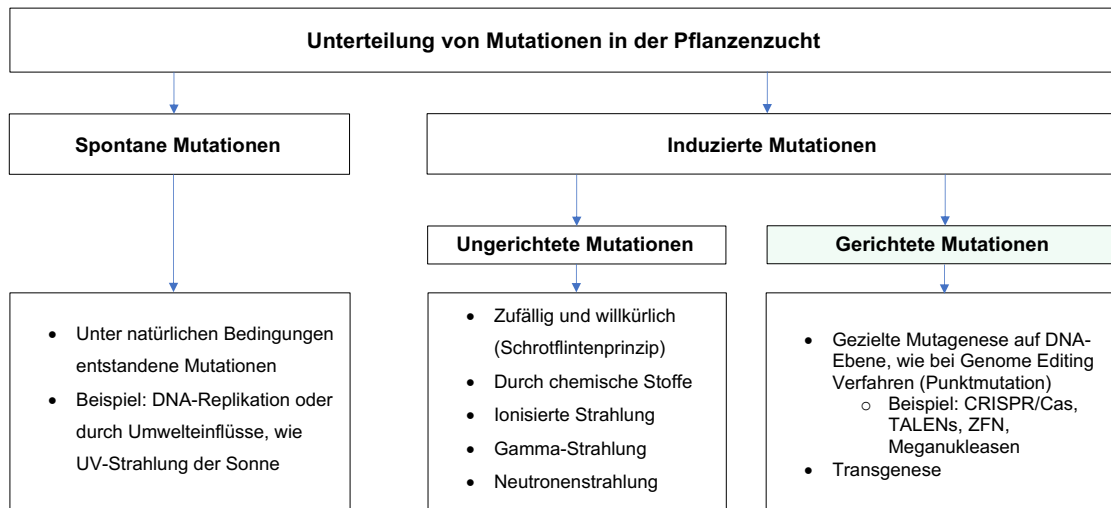


Abbildung 2: Mutationen in der Pflanzenzucht

3.4. (Grüne) Gentechnik

Die Gentechnik gehört zu den Verfahren der Biotechnologie. Sie ist nicht imstande das grundlegende Vorgehen in der Pflanzenzüchtung zu revolutionieren. Stattdessen wird es von ihr beschleunigt, verbessert und optimiert. Die Grüne Gentechnik ermöglicht den Eingriff in das Erbgut von Pflanzen, wodurch einzelne oder wenige Merkmale bearbeitet werden können. Hierbei werden genetische Informationen aus anderen Organismen wie Bakterien, Pilzen oder Tieren isoliert und in das Pflanzengenom eingebracht, was als Transformation bezeichnet wird. Hierfür kommen unterschiedliche Vektoren zum Einsatz, die als Transportvehikel fungieren und hauptsächlich bakteriellen oder viralen Ursprungs sind (Brunner et al., 2019, p. 127-132).

Durch die Transformation von Fremd-DNA werden die Kombinationsmöglichkeiten sowie die genetische Variabilität gesteigert. Ein komplexer Genpool stellt die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Züchtung dar, aus der eine neue Pflanzensorte generiert werden soll. Durch die Überwindung von Art-Grenzen erreichen Forscher Zuchtziele, die durch herkömmliche Züchtungsmethoden unmöglich hätten erreicht werden können. Pflanzen, die durch das Einbringen von Fremd-DNA entstanden sind, werden als transgene Pflanzen bezeichnet. Pflanzen, bei denen Merkmale aus der gleichen Art übertragen werden, sind als cisgene Pflanzen einzustufen. Sie hätten theoretisch auch durch langwierige Kreuzungsprozesse entstehen können. Durch die angewandte Gentechnik konnte der Prozess, neue Eigenschaften in die Pflanze einzubringen, zeitlich deutlich reduziert werden (Heberer, 2021, p. 9). Nachfolgend wird eine für Tomaten und Kartoffeln relevante

Transformation vorgestellt, die auch für die Anwendung von CRISPR/Cas eine wesentliche Rolle spielt.

3.4.1. Transformation durch *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens besitzt zwei Arten von DNA (Bakterien- und ringförmige Plasmid-DNA). Es handelt sich um ein pathogenes, pflanzenparasitäres Bodenbakterium, was verletzte Pflanzenteile befällt, indem es an entsprechenden Stellen andockt. So überträgt es auf natürliche Weise einen definierten Teil seiner DNA (T-DNA, des Tumor-induzierenden (Ti)-Plasmids) auf dem tumorauslösende Eigenschaften kodiert sind (Kadereit et al., 2021, p.325). Die Forschung verwendet heute abgeschwächte Ti-Plasmide (Kempken & Kempken, 2012, p. 13,14), bei denen die Tumorbildung ausbleibt und stattdessen Gene, die vorteilhaftere Eigenschaften für Pflanzen auslösen, in den Zielorganismus eingebracht werden können (Ganapathi' et al., 2004, p. 171-184). Damit kann ein variabler Teil der Plasmidinformation stabil in das Erbgut der Pflanze integriert werden. Der Großteil der Plasmid DNA enthält Gene, die für die Übertragung in die Pflanze notwendig sind und im Bakterium verbleiben. Die *Agrobacterium* vermittelte Transformation zeigt ihre Hauptwirksamkeit primär bei Gentransferen von zweikeimblättrigen Pflanzen, wie Kartoffel, Tomate und Tabak (Van Eck et al., 2019, p. 225-226).

3.4.2. Weitere Gentechnische Methoden

Die Biolistische Transformation wird auch als Gentransfer durch Partikelbeschuss bezeichnet. Es werden DNA-Partikel beispielsweise Gold- oder Wolfram-Mikropartikel beschichtet und mit den gewünschten DNA-Sequenzen beladen. Diese Partikel werden mit hoher Geschwindigkeit in die Pflanzenzellen geschossen. Diese Methode ist unabhängig von biologischen Vektoren. Protoplasten entstehen, wenn Zellwände von Pflanzenzellen durch eine enzymatische Behandlung entfernt werden. Diese werden mit der gewünschten DNA, die veränderte Eigenschaften trägt, behandelt und in das Protoplasten-Genom eingeführt. Daraufhin folgt die Regeneration in Pflanzenzellen. Diese Methode wird als Protoplastentransformation bezeichnet (Heberer, 2021, p. 10). Bei der RNA-Interferenz werden siRNA (small interfering RNA) oder miRNAs (microRNA) verwendet, um bestimmte Gene im Zielorganismus zu unterdrücken oder zu regulieren, wodurch Gene Veränderungen von Pflanzeigenschaften erzielen können (Graw, 2015, p. 300-303).

Die Verfahren der Genom-Editierung unterstehen ebenfalls der Grünen Gentechnik. Hinführend auf die CRISPR/Cas Technologie werden diese Verfahren im kommenden Abschnitt behandelt und im Detail erläutert.

3.5. Biologisches Hintergrundwissen

Nachstehende Unterkapitel bieten eine Einführung der biologischen Mechanismen des CRISPR/Cas Systems auf dessen Grundlage die heutigen biotechnologischen Anwendungen der Genome Editing Verfahren in der Pflanzenzucht basieren.

3.5.1. Vorwissen zu molekularen Scheren

Alle Lebewesen (Bakterien, Pflanzen, Tiere und Menschen) tragen ihre genetische Information in den Zellen der DNA. Während eines Lebenszyklus kann es zu bestimmten Zeitpunkten zu einer neuen Kombination der genetischen Information kommen. Wenn zum Beispiel mütterliche und väterliche Genanalgen neu kombiniert werden oder Gene in Zellen des menschlichen Immunsystems für die Abwehr von Krankheitserregern (Bildung von Antikörpern) neu verknüpft werden. Um eine solche neue Verknüpfung herbeizuführen ist es notwendig bestimmte Kombinationen zu ändern. Dies wird durch das Spalten der DNA an einigen Stellen ermöglicht. Hierfür hat die Natur molekulare Scheren vorgesehen (Nukleasen). Nukleasen gibt es in großer Anzahl. Sie sind in viele unterschiedliche Arten unterteilt und kommen in allen Lebewesen vor. Die DNA zu schneiden, um eine genetische Veränderung zu erzielen, ist somit ein Grundprinzip der Natur und keine Erfindung der Menschheit (Cathomen & Puchta, 2018, p. 2).

Die sogenannten Restriktionsendonukleasen stellten die ersten molekularen Scheren dar, die in Bakterien entdeckt wurden (Roberts, 2005, p. 5905-5908). Die Restriktionsenzyme können allerdings weder in pflanzlichen noch in menschlichen Zellen angewendet werden. Das liegt daran, dass ihre Erkennungssequenz circa 1 Million Mal im menschlichen Genom vorliegt und die Restriktionsenzyme somit an vielen unterschiedlichen Stellen auf einem menschlichen DNA-Strang einen Schnitt auslösen würden. Dasselbe Phänomen ist auf Pflanzenarten übertragbar, die ebenso unterschiedliche Anzahlen an potenziellen Restriktionsenzym-Schnittstellen auf der DNA aufweisen, weshalb deren Anwendung für die Pflanzenzucht als ungeeignet eingestuft wird (Heckmann & Paradisi, 2020, p. 6082).

Meganukleasen entstammen ursprünglich der Hefe und ihre Fähigkeit Sequenzabfolgen zu erkennen beträgt 20 bis 24 Basenpaare, was für die Identifizierung einer gezielten Stelle eines komplexeren Genoms ausreicht. Meganukleasen kommen den Restriktionsenzymen hinsichtlich des Aktivitätsvermögens sehr nah, sind von der Spezifität her dennoch deutlich zuverlässiger. Lange Zeit gestaltete sich die Reprogrammierung von molekularen Scheren als eines der größten Herausforderungen. Es erwies sich als schwierig, eine natürliche

Meganuklease gezielt zu verändern. Die Lösung des Problems waren künstliche Genscheeren, die durch Proteinengineering hergestellt werden konnten (Tröder & Zevnik, 2022, p. 60-62).

3.5.2. Genome Editing (Genom-Editierung)

Genome Editing wird in der Pflanzenwissenschaft sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der molekularen Pflanzenzüchtung angewendet. Es ist der Überbegriff unterschiedlicher Verfahren, die als Grundprinzip Genschnitt-Technologien anwenden, um im Genom von Pflanzen positive Eigenschaften hervorzubringen. Genome Editing ist eine, gemessen an anderen Verfahren der Gentechnik, neue Methode und bietet im Vergleich zu herkömmlichen und bereits beschriebenen Verfahren einen entscheidenden Vorteil. Neue Pflanzeigenschaften können gezielt an bestimmten Stellen in das Pflanzengenom eingefügt, ausgetauscht oder bereits vorhandene Eigenschaften entfernt werden, ohne dabei fremde DNA einführen zu müssen. Anders als genetisch veränderte Pflanzen sind genomeditierte Pflanzen nach vollständigem Herstellungsprozess transgen-frei (Friedrichs et al., 2019, p. 208-2010).

Die verschiedenen Verfahren des Genome Editings, beruhen auf einem grundlegend vergleichbaren Vorgehen, welches an erster Stelle die Position, die im Pflanzengenom verändert werden soll, ausfindig macht. Exakt an dieser Stelle wird die DNA, in der Regel mit Hilfe eines Proteins aufgetrennt und darauffolgend repariert. Der gezielte Austausch, das Entfernen oder Einfügen weniger Nukleotide sorgt für die gewünschte züchterische Eigenschaft ohne auf Art-Fremde DNA zurückzugreifen (Fehse et al., 2021, p. 220-221). Die grundlegenden Ziele der Genom-Editierung sind Knockouts, Knockins und Punktmutationen hervorzurufen, in anderen Worten, Gene im Genom zu zerstören, einzufügen oder gezielte Basen zu verändern (Ahmar et al., 2020, p. 8). Nachfolgend werden zwei unterschiedliche Ansätze in der Genom-Editierung vorgestellt.

Oligonucleotide directed mutagenesis (ODM)

Die Oligonukleotid-gestützte Genom-Editierung (ODM) stellt künstliche, kleine Erbgutmaterial-Stücke her, die als Oligonukleotide bezeichnet werden und in die Pflanzenzelle eingebracht werden. Die Oligonukleotide werden von dem zelleigenen Reparatursystem erkannt, da sie fast deckungsgleich mit den ausgewählten Genen sind, die im Genom des Ziel-Organismus verändert werden sollen. Sie erzeugen keine Doppelstrangbrüche. Durch den Versuch, den Unterschied des Ursprungsstrangs und dem minimal abweichendem

Oligonukleotid auszugleichen, entstehen die gezielten Mutationen auf der DNA (Kadereit et al., 2021, p. 334-335).

Site directed nucleases (SDN)

Ortsspezifische Nukleasen sind Enzyme, die an bestimmte Standorte im Genom geleitet werden, um dort einen Doppelstrangbruch zu bewirken. Die Enzyme werden durch eine RNA zu der gewünschten Sequenz geführt. *Zinkfinger-Nukleasen (ZFNs)*, *Transcription-activator-like effector nucleases (TALENs)* und das CRISPR/Cas-System sind in der Praxis angewandte Beispiele. Bei ZFN bindet das synthetisch hergestellte Zinkfinger-Protein an die gewünschte DNA-Stelle, bei TALENs ist es die TALEN-Domäne und bei CRISPR/Cas ist es entsprechend das Cas-Protein, was den Doppelstrangbruch hervorruft (Heberer, 2021, p.12.)

ZFN stellten die erste Generation von künstlich hergestellten Molekularscheren dar. Nachteilig war die aufwendige und zeitintensive Herstellung. Weitere Nukleasen, dessen Handhabung einfacher als ZFN war, stammten aus Pflanzenbakterien der Gattung *Xanthomonas*, die TALENs darstellten (Gupta & Musunuru, 2014, p. 4154-4160). Erst durch die Anwendung von CRISPR/Cas konnte die aufwendige Herstellung von synthetischen Nukleasen auf ein Minimum reduziert werden (Cathomen & Puchta, 2018, p. 2-4).

Im nächsten Schritt ist eine Timeline zur Entstehung der CRISPR/Cas-Technologie aufgeführt. Dies ermöglicht einen ersten Überblick über die Technologie, bevor im weiteren Verlauf näher auf diese eingegangen wird.

3.6. Timeline CRISPR/Cas9

Die Timeline bezieht sich anfangs ausschließlich auf das CRISPR/Cas9-System. Andere Endonucleasen werden erst hinsichtlich Effizienz- und Präzisionssteigerung erwähnt.

Entdeckung des CRISPR/Cas-Systems in Bakterien

1987 wurde die Existenz des CRISPR/Cas9-Systems während einer Genanalyse von *E. Coli* in Japan in Bakterien festgestellt. Die Entdeckung von CRISPR und seiner Funktion geschah 1993 durch Francisco Mojica, Alicante, Spanien. Er stellte die Hypothese auf, es handle sich um ein adaptives Immunsystem von Bakterien und Archaeen (Mojica et al., 2005, p. 174).

Identifizierung der Cas9-Endonuklease

2005 wurde *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) sequenziert. Horvath & Barrangou identifizierten das Cas9-Protein in den *CRISPR-Loci* des Bakteriums. Zudem wurde das Protospacer Adjacent Motif (PAM) identifiziert (Horvath & Barrangou, 2010, 167).

Funktion des adaptiven Immunsystems bestätigt

Der Beweis, dass es sich bei CRISPR um ein adaptives Immunsystem handelt, liegt durch die experimentelle Demonstration im Jahre 2007 mit *S. thermophilus* vor. Die Reaktion des Milchsäurebakteriums während eines Phagenangriffs sollte untersucht werden (Barrangou et al., 2007, p. 1709).

Zusammenspiel von crRNA und Cas9-Protein

Eine Demonstration an *E. Coli*, zeigte im Jahr 2008, dass die crisprRNA (crRNA) das Cas9-Protein zur Ziel DNA führt (Brouns et al., 2008, p. 960).

CRISPR/Cas verursacht Doppelstrangbrüche

2010 wurde die Erkenntnis gewonnen, dass CRISPR/Cas9 Doppelstrangbrüche in der Ziel-DNA an genauen Positionen (3 Nukleotide vor dem PAM) erzeugt und das Cas9 das einzige Protein ist, das für den Komplex benötigt wird (Garneau et al., 2010, p. 67).

Cas9 als Genschere für Genom-Editierung

2011 werden Genome Editing Verfahren zur biochemischen Methode des Jahres gewählt (ZFN, TALEN und Meganukleasen). Emmanuelle Charpentier und ihr Team stellten die Idee vor, das Cas9-Enzym als Nuklease zur gezielten Genom-Editierung einzusetzen. Es wurde die tracrRNA (trans-activating crRNA) entdeckt, die als Helfer-RNA zur Bildung der crRNA unterstützt (Deltcheva et al., 2011, p. 602).

Beliebiges Programmieren von Cas9-Proteinen

Jennifer Doudna und Emmanuelle Charpentier fanden 2012 heraus, dass der CRISPR/Cas9-Komplex nicht nur in Bakterien, sondern auch in allen lebenden Zellen funktioniert. Gleichzeitig zeigten sie, dass die pre-crRNA und die tracrRNA für die Ausbildung der crRNA miteinander verschmelzen (Jiinek et al., 2012, p. 3). CRISPR kann neu programmiert werden, um einen beliebigen Ort in der DNA anzusteuern (Gasiunas et al., 2012, p. 579).

CRISPR/Cas in eukaryotischen Zellen und Adressierung mehrere Loci möglich

2013 adaptierte Zhang, Cong et al. als erster CRISPR/Cas9 erfolgreich in eukaryotischen Zellen (Cong et al., 2013, p. 819).

Kontinuierliche Effizienz- und Präzisionssteigerung

Nach 2015 werden weitere CRISPR/Cas -Varianten wie Cpf1 und Cas12a verwendet und der Begriff Genome Editing etabliert sich (Shmakov et al., 2015, p. 385).

Nobelpreisträgerinnen für Chemie

2020 erhielten Emmanuelle Charpentier und Jennifer A. Doudna den Nobelpreis für Chemie. Die beiden Forscherinnen nahmen den Preis in Schweden für die Entwicklung der CRISPR/Cas9-Methode zur Genom-Editierung entgegen (Cathomen & Puchta, 2018, p. 177).

3.7. Bakteriell CRISPR/Cas-System

Das nachfolgend dargestellte Prinzip des CRISPR/Cas-Systems bezieht sich auf seine bakterielle Ursprungsform, wie sie bereits in zuvor beschriebener Timeline angesprochen wurde.

3.7.1. Struktur des CRISPR/Cas-Systems

Nicht nur Menschen, sondern auch Bakterien können von Viren infiziert werden. Daher haben sie ein Immunsystem, um sich gegen Phagen-Angriffe zu wehren. Bakterien erkennen und zerschneiden die fremde Virus-DNA, um sie unschädlich zu machen (siehe: Prinzip Adaptives Immunsystem). Die Sequenzen im Erbgut der Bakterien, die für diese Abwehr verantwortlich sind, werden als CRISPR bezeichnet. Sie sind Bestandteil des Abwehrsystems namens CRISPR/Cas.

Das System im Bakteriengenom besteht aus drei wesentlichen Bauteilen. Das Zusammenspiel dieser Bauteile wird auch als CRISPR/Genlocus bezeichnet. Das erste Bauteil ist ein DNA-Abschnitt der als CRISPR-Array bezeichnet wird. Ausgeschrieben bedeutet CRISPR: „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“. Ins Deutsche wird diese Bezeichnung wortwörtlich als: „gruppierte regelmäßig geteilte kurze palindromische Sequenzen“ übersetzt. Anders ausgedrückt sagt diese Abkürzung aus, dass der CRISPR/Array abwechselnd aus kurzen Abschnitten von Repeats besteht, die durch sogenannte Spacer auch Protospacer genannt, unterbrochen werden. Bei den Repeats handelt es sich um palindromische Sequenzen (Hardt, 2019, p. 19-20). Das Erkennungszeichen

palindromischer Sequenzen besteht darin, dass sie von links und rechts gleichermaßen lesbar sind, ähnlich wie bei den Namen: Anna, Hannah, Otto, Bob etc. (Datta & Rister, 2022, p. 2-10).

Die Spacer-Sequenzen hingegen bestehen aus variablen, kleinen DNA-Sequenzen, die die Repeats voneinander abgrenzen und Bestandteile von viraler Fremd-DNA enthalten.

Der zweite wichtige Baustein ist die Leadersequenz. Sie befindet sich am Anfang eines CRISPR-Locus und enthält größtenteils Adenin und Thymin. Die Leadersequenz trägt relevante Informationen, damit die crRNA, auch Leit-, Ziel- oder Guide RNA (gRNA) genannt, hergestellt werden kann. Somit leitet die Leadersequenz den Start zum Ablesen des CRISPR-Arrays ein und sorgt dafür, dass der CRISPR/Cas-Komplex aktiviert wird (J. Y. Wang et al., 2022, p. 641).

Der dritte Bestandteil umfasst die Cas-Gene. Die englische Bezeichnung lautet: CRISPR/associated (deutsch: CRISPR/assoziiert). Hierzu zählen unterschiedliche Endonukleasen, die befähigt sind, DNA zu zerschneiden. Folgende Abbildung soll die schematische Struktur des CRISPR/Cas-Systems vereinfacht darstellen (Kempken, 2020, p. 79).

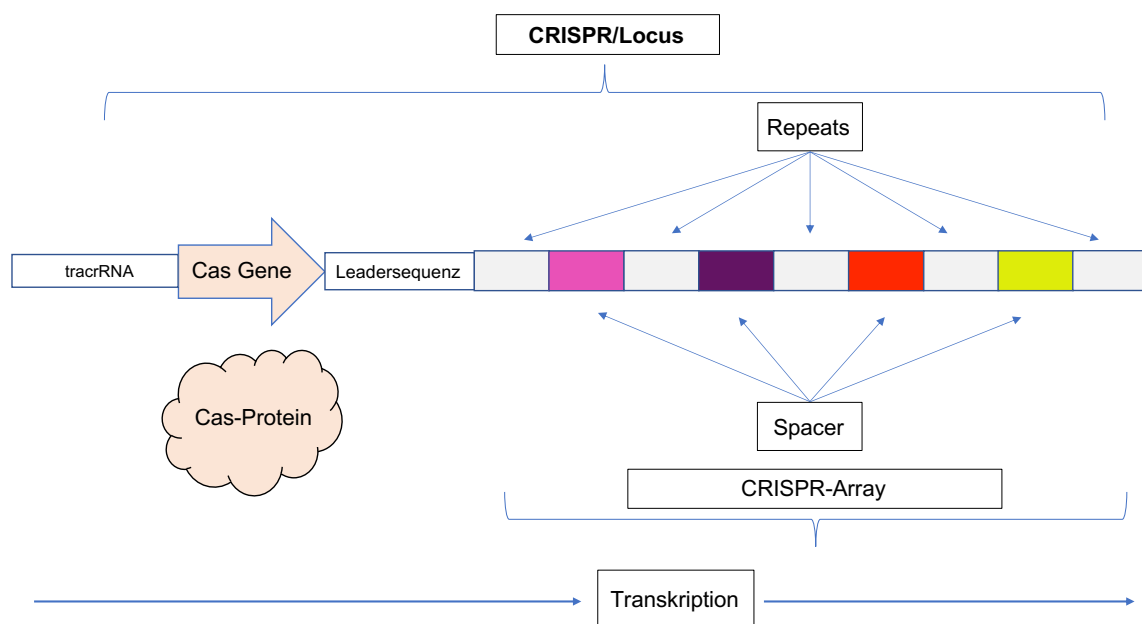


Abbildung 3: Bestandteile CRISPR/Cas modifiziert nach: Matissek und Fischer, 2021

3.7.2. Prinzip Adaptives Immunsystem

Das CRISPR/Cas9-System wurde als Abwehrmechanismus in Bakterien (*Streptococce*) entdeckt. Ursprünglich ging es dabei darum verstehen zu wollen, wie sich Bakterien vor Viren schützen. Bei einem Phagen-Angriff binden sich Viren an die Oberfläche der bakteriellen Zellwand und injizieren ihre DNA von dort aus direkt ins Zellinnere. Dort vervielfältigt das Bakterium die virale DNA automatisch mit. Häufig endet ein Virusbefall für Bakterien tödlich, weshalb eine Verteidigungsstrategie seitens der Bakterien entwickelt wurde (Wirth, 2021, 136-139).

Bakterien integrieren beim Erstkontakt mit einem Virus deren DNA in Form kleiner Fragmente (Spacer-Sequenzen) in die eigene Bakterien DNA. Diese Spacer-Sequenzen enthalten gespeicherte „Erinnerungen“, die aus früheren Infektionen des Bakteriums durch Viren oder generell fremder DNA stammen.

Nachfolgend ist ein Schaubild dargestellt, wie das Bakterien-Genom nach dem viralen Erstkontakt aussieht:

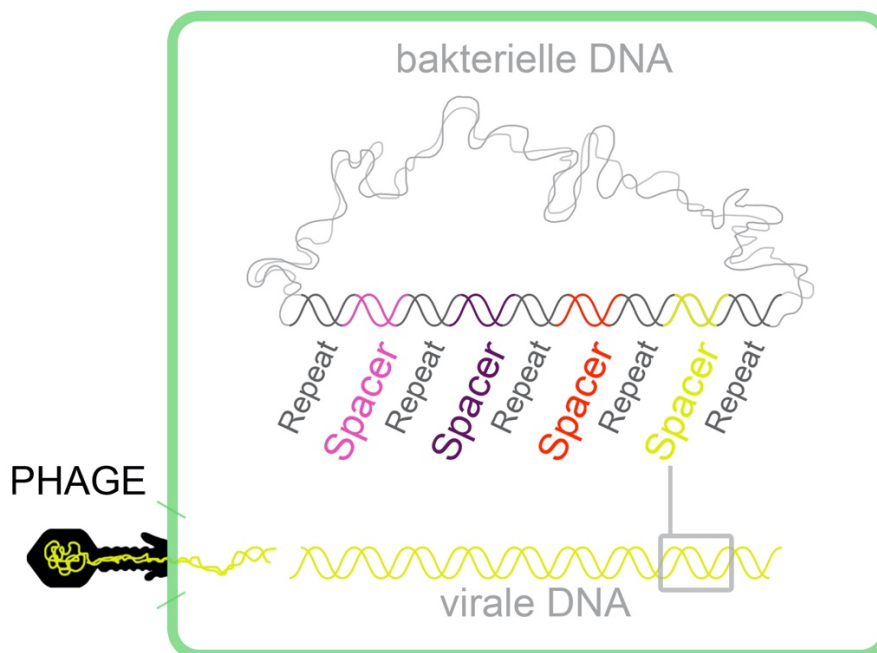


Abbildung 4: Adaption, modifiziert nach: Paris, 2023

Kommt es zu einem erneuten Virusangriff, dessen DNA dem Bakterium bekannt ist, besteht ein sofort aktivierter Immunschutz, da die feindlichen Viren durch die vorhandene „Viren-DNA-Bibliothek“ auf dem CRISPR/Array der Bakterien erkannt werden und imstande sind, abgewehrt zu werden (Graw, 2015, p. 302). Dafür wird die gespeicherte genetische Information des angreifenden Virus auf dem CRISPR/Array des Bakteriums in eine lange Vorläufer DNA (pre-crRNA) transkribiert, die komplementär zu den Zielregionen der fremden

DNA ist. Die lange pre-crRNA verbindet sich mit der tracrRNA und wird durch das Cas-Protein und ein Enzym namens RNaseIII in kurze Stücke mit jeweils einem einzigen Spacer prozessiert. Somit wird für jede erkannte fremde DNA-Sequenz eine eigene crRNA erstellt. Um einwandfreie crRNAs zu erhalten, bilden die palindromischen Sequenzen auf der pre-crRNA Haarnadel-Strukturen aus. Diese Struktur lässt sich von Cas-Enzymen gut erkennen und zeigt ihnen an, wo sie die pre-crRNA schneiden müssen, damit die funktionalen Spacer-Abschnitte durch Zertrennen der Cas-Enzyme generiert werden können (Lander, 2016, p. 679-690).

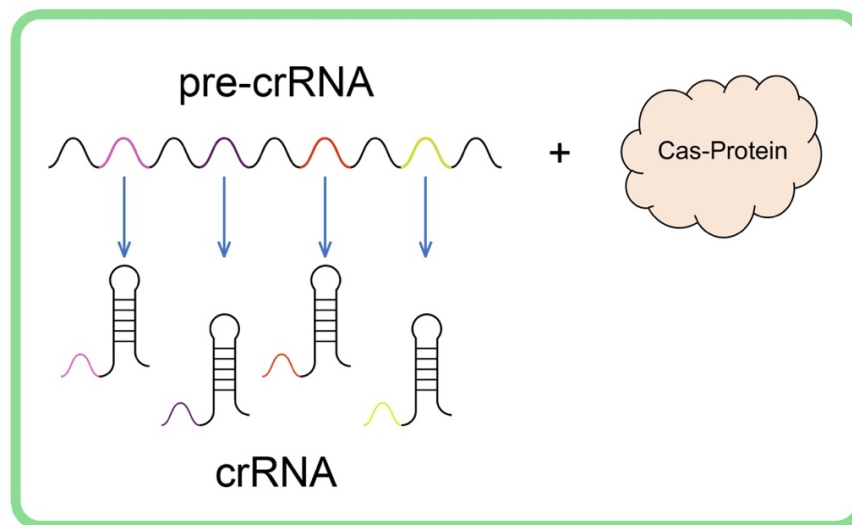


Abbildung 5: Expression, modifiziert nach: Paris, 2023

Mit Hilfe der vollständig ausgeprägten gRNA(s) kann die Endonuklease Cas sich den Weg zu der Ziel-DNA weisen lassen. Die gRNA(s) legen somit die Spezifität des Cas-Proteins fest. Eine Bindung an die Fremd-DNA ist allerdings nur dann möglich, wenn eine PAM Sequenz in der Fremd-DNA vorliegt. Hierbei handelt es sich um eine spezifische DNA-Sequenz, die aus drei Basen besteht und dem Cas-Protein als eine Art Erkennungssequenz dient, um die Zielsequenz ausfindig zu machen (Bolotin et al., 2005, p. 2559). PAMs sind sinnvoll, damit Bakterien nicht versehentlich ihre eigene DNA angreifen. Im Anhang II ist eine Übersicht zu finden, die unterschiedliche Cas9-Nukleasen, die aktuell existieren, mit ihren jeweiligen Ursprungsorganismen und entsprechend kodierten PAM Sequenzen zeigt. Liegt eine PAM-Sequenz im Ziel-Genom vor, bindet die gRNA an dem entsprechenden Strang. Durch das immunologische Gedächtnis des Bakteriums spaltet das Cas-Protein die schädliche DNA-Sequenz und es kommt zu einem Doppelstrangbruch. Die virale DNA-Spaltung durch Cas9 stört die Infektion und es kommt zum Abbruch. Damit kann das Überleben des Bakteriums aufrechterhalten- und sichergestellt werden (Niemann & Wrenzycki, 2023, p. 154).

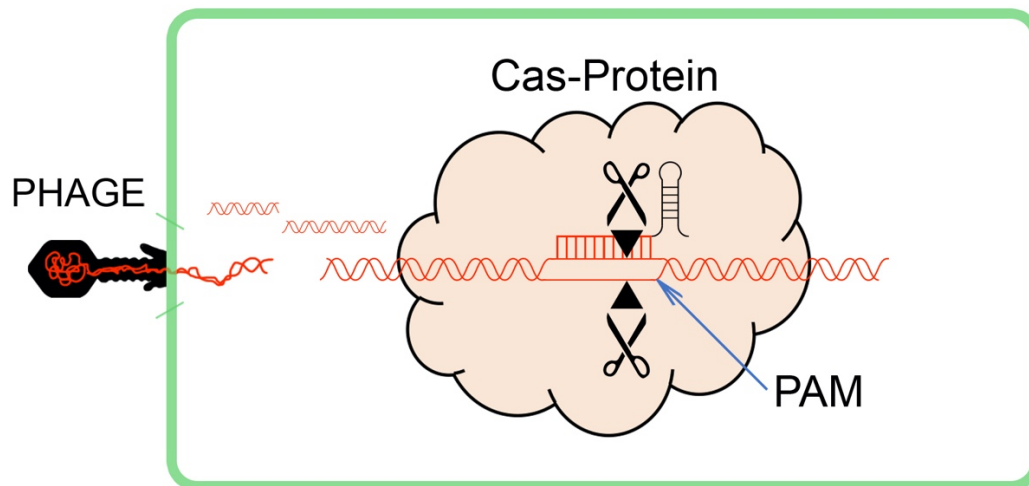


Abbildung 6: Interferenz, modifiziert nach: Paris, 2023

3.8. Biotechnologische Anwendung von CRISPR/Cas in der Pflanzenzucht

Das Werkzeug wurde fortlaufend weiterentwickelt, bis es zu einer Art Navigationssystem konstruiert wurde, das ein definiertes Transportgut zu einer speziellen Position im Pflanzengenom navigieren kann (Thrän & Moesenfechtel, 2020). Das Prinzip des zuvor beschriebenen, adaptiven Immunsystems von Bakterien wird sich somit bei unterschiedlichen Fragestellungen in der Pflanzenforschung zu nutzen gemacht. Das synthetisch oder in vitro transkribierte Ribonukleinsäure (RNA)-Fragment ist für die Sequenzen deren Eigenschaften in Zielorganismus verändert werden sollen spezifisch. Ziel-RNAs werden entweder mit dem in vitro exprimierten und gesäuberten Cas-Protein gekoppelt oder es wird in den Zellen des Zielorganismus selbst produziert. Somit existieren unterschiedliche Methoden, um eine effiziente Bindung zwischen der RNA und dem Cas-Protein zu erzielen - entweder in einem Reaktionsgefäß oder in der Zelle selbst. Wie aus dem zuvor beschriebenen Prinzip hervorgeht, ermöglichen die Haarnadelstrukturen dem Cas-Protein eine Bindung einzugehen. Die konstruierten CRISPR/Cas-Komplexe rufen gleichartiger Doppelstrangbrüche in der DNA der Zielpflanze hervor, wie bei dem ursprünglich entdeckten Mechanismus des adaptiven Immunsystems von Bakterien. Dabei bleibt das restliche Genom intakt.

Sobald der CRISPR/Cas-Komplex seine Hauptaufgabe (auslösen der Mutation) erfüllt hat, wird Leit-RNA und Cas9-Protein selbstständig von der Zelle abgebaut. Der Genkonstrukt, der das CRISPR/Cas-Werkzeug in die Pflanzenzelle transportiert, folgt den Mendelschen Regeln. Das heißt, dass nach der Vermehrung, das Genkonstrukt in $\frac{1}{4}$ der Pflanzennachkommen nicht mehr vorliegt. Diese Pflanzen können als erfolgreich editiert bezeichnet

werden und sind gleichzeitig nachweislich transgen-frei. Ausschließlich das Viertel, bei dem durch das Vererbungsgesetz das Genkonstrukt nicht weitervererbt wurde, dient als Vorlage, für eine neue Pflanzenart, die vorteilhaftere Eigenschaften aufweisen soll. Ausgebrachtes, durch CRISPR/Cas verändertes Saatgut, besitzt somit nur noch das editierte Merkmal (zum Beispiel die Resistenz gegenüber einem Schädling). Dieses Merkmal wird fortan durch jede Generation weitervererbt. gRNA, Cas-Enzym und Transportmittel sind nicht mehr nachweisbar. Hierdurch liegen keine DNA-Spuren vor, die eine Aussage zu dem angewandten Verfahren erlauben, sodass es keinen Nachweis darüber gibt, ob das Merkmal seinen Ursprung aus der herkömmlichen Züchtung hat oder durch CRISPR/Cas rein-editiert wurde.

Zum einen lässt sich dadurch die Funktion von Genen erforschen und zum anderen können Pflanzeigenschaften mit effektiveren Merkmalsausprägungen entwickelt werden (Clemens, 2021, p. 343).

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, von mehreren Leit-RNAs gleichzeitig Gebrauch zu machen und unterschiedliche Positionen im Genom gleichzeitig zu schneiden, wodurch mehrere Pflanzeigenschaften parallel editiert werden. Hierbei spricht man von Multiplex-Verfahren. Mit anderen molekularen Scheren besteht diese Möglichkeit nur unter Umständen (Cathomen & Puchta, 2018, p.4).

3.8.1. Methoden zum Einbringen des CRISPR/Cas-Systems in die Pflanze

Das CRISPR-Werkzeug wird hauptsächlich über vektorgestützte Methoden in die Pflanzenzellen eingebracht. Ebenso existieren Transportvektoren, die nicht auf Verfahren der klassischen Gentechnik beruhen. Es wird erwartet, dass DNA-Bausteine, die ein neues Merkmal tragen, in naher Zukunft direkt und ohne ein Transportmittel editiert werden können (J. Kurreck et al., 2022, p.1010). Nachstehend sind die wichtigsten Techniken aufgeführt und näher erläutert.

Vektorgestützte Methoden

Die vektorgestützten Methoden umfassen Techniken, bei der das CRISPR/Cas-System verpackt in einem Trägermolekül in die Pflanzenzellen gelangt. Die vektorgestützten Transformationstechniken unterscheiden sich durch das gewählte Transportvehikel.

Agrobacterium vermittelte Transformation

Die bereits erwähnte Agrobacterium vermittelte Transformation, die bei transgenen Verfahren für die Übermittlung fremder DNA häufig zum Einsatz kommt, ist bei der Anwendung von CRISPR/Cas ebenso populär, da sich der Vektor ausschließlich temporär im Pflanzen Genom aufhält und keine artfremde DNA transportiert wird (Hwang et al., 2017). Die in Agrobakterien enthaltenen Plasmide übertragen somit statt Fremd-DNA wirkungsvoll das CRISPR/Cas-System in die Pflanzenzelle. Sie werden je nach Anwendung unter Laborbedingungen designt (Kadereit et al., 2021, p. 320).

Virus vermittelte Transfektion

Bei der Virus vermittelten Transfektion stellen Viren das Transportvehikel dar, um CRISPR/Cas in Pflanzenzellen zu integrieren. Die Viren sind dabei modifiziert, sodass weder Pflanzenkrankheiten verursacht noch Viren-DNA in der Pflanze repliziert werden können. Es wird ausschließlich der CRISPR/Cas-Komplex übertragen (Bansal & Wani, 2022, p. 197-203).

Nanopartikel vermittelte Transfektion

Der CRISPR/Cas-Komplex wird auf den Oberflächen der Nanopartikel adsorbiert, sodass die Nanopartikel ihre Funktion als Transportmittel ausüben können und den Komplex in die Ziel-DNA befördern. Nanopartikel werden nach Abschluss der Genom-Editierung von der Zelle identifiziert und über intrazelluläre Mechanismen sowie entsprechende Enzyme abgebaut (Alghuthaymi et al., 2021, p. 1).

Bei den aufgeführten Methoden, um den CRISPR/Cas Komplex gemeinsam mit dem Vektor in Pflanzenzellen zu integrieren, ist es erforderlich, den CRISPR/Cas-Komplex vorab mit zum Beispiel Elektroporation in das Transportvehikel zu transformieren. Anschließend werden die transformierten Vektoren zur Vermehrung in Kulturmedien gebracht. Daraufhin werden auf zerschnittenen Keimblättern oder Pflanzengewebe der Ziel-Pflanze das Kulturmedium mit Transportvektor und CRISPR/Cas-Komplex aufgetragen. Zum Beispiel „infizieren“ Agrobakterien die Pflanzenzelle, indem die genetische Information auf das verletzte Ausgangsmaterial übertragen wird und der CRISPR/Cas Komplex damit in den Pflanzenzellen freigesetzt wird. Der detaillierte Ablauf ist in 3.9: Kultivierung von Pflanzenzellen einzusehen. Bei der Nanopartikel vermittelten Transfektion muss das Zellgewebe ebenfalls mit den Partikeln in Kontakt treten und gegebenenfalls gemeinsam in dem Kulturmedium inkubiert werden, um die Freisetzung des CRISPR/Cas Komplexes zu bewirken (Pramanik et al., 2021, p. 13-14).

Vektorfreie Methoden

Darüber hinaus gibt es weitere Transportmethoden die eindeutig transgen-freie Lösungen in der Genom-Editierung darstellen, um den CRISPR/Cas-Komplex in die Pflanzenzelle einzuführen. Hierbei handelt es sich um die Integration von mRNA und Ribonucleoproteinen (Stewart et al., 2018, p. 7, 11) durch Elektroporation oder Mikroinjektion. Bei der Elektroporation werden temporäre Poren in der Zellmembran erzeugt, indem vereinzelt, elektrische Impulse auf die Pflanzenzellen ausgeübt werden. Die erzeugten Poren erlauben dem CRISPR/Cas-Komplex leichter die Zellmembran zu überwinden. Nach dem Passieren des CRISPR/Cas-Komplexes in die Zelle schließen sich die Poren und lassen keine Rückstände zurück. Elektroporation kann auch verwendet werden, um CRISPR/Cas in Agrobakterien zu transformieren oder direkt in Protoplasten zu überführen. Bei der Mikroinjektion wird eine gezielte Injektion des CRISPR/Cas-Komplex durch eine feine Mikronadel in die Pflanzenzelle erwirkt (Zhang et al., 2021. p. 616).

Die Verwendung von Transportvehikeln führt häufig zum gesteigerten Erfolg hinsichtlich des Einbringens von CRISPR/Cas in die Pflanzenzelle, im Gegensatz zu vektorfreien Methoden (Demirer et al., 2021, p. 243).

Die zelleigenen Reparaturmechanismen versuchen nach dem Zertrennen des DNA-Stranges durch das Cas-Enzym den zerschnittenen DNA-Strang zu reparieren. Dabei treten meistens Fehler auf, wodurch das Gen nicht einwandfrei abgelesen werden kann und somit die Bildung eines bestimmten Proteins nicht mehr stattfindet. Nach dem Schneiden durch das Cas-Protein könnten während der Reparatur weitere DNA-Bausteine ausgetauscht oder neue Sequenzen in den DNA-Strang eingebaut werden. Wird ein Doppelstrangbruch herbeigeführt und anschließend repariert, liegt hier derselbe grundlegende Mechanismus vor, wie bei einer zufälligen und natürlichen Mutation.

3.8.2. Reparaturmechanismen

Nachdem das Cas-Protein die DNA im Zielbereich aufgespalten- und den Doppelstrangbruch hervorgerufen hat, erkennt die Zelle den lokalen Schaden und aktiviert die zelleigenen Reparaturmechanismen, die für die veränderte DNA-Sequenz verantwortlich sind. Es gibt zwei grundlegende Reparaturmechanismen, die nach einem CRISPR/Cas Doppelstrangbruchs erfolgen können (H. Yang et al., 2020, p. 2-7).

Non-Homologous End Joining-System (NHEJ)

Dieser Reparaturmechanismus ist am schnellsten und wird häufig eingesetzt. Die hierbei auftretende fehleranfällige Reparatur wird sich zu nutzen gemacht (Gehrke et al., 2022). Technisch gesehen werden die beiden Enden des hervorgerufenen Doppelstrangbruches erneut miteinander verbunden, wobei während der Reparatur falsche Basen verbaut-, kleinere DNA-Bereiche entnommen (Deletionen) oder wenige kleine DNA-Stücke hinzugefügt (Insertionen) werden können. Insgesamt handelt es sich um minimale Veränderungen von einer bis weniger Basenpaare, die manipuliert werden. Im Fall der Doppelstrangreparatur durch die Technik des NHEJ wird auch oft von einer site directed nuclease-1 (SDN-1 Technik) gesprochen, bei der zuverlässige und ortsspezifische Veränderungen von wenigen Basenpaaren erfolgen, das Ausmaß der Veränderung jedoch nicht gut vorhersehbar ist. Ob eine Deletion oder Insertion stattfindet und mit welcher Basenlänge die Mutation am Ende vorliegt, ist unklar (Jang & Joung, 2019, p. 1-10).

Homology Directed Repair (HDR)

Wenn kleinere oder größere gerichtete Veränderungen an der DNA hervorgerufen werden sollen, wird der HDR Reparaturmechanismus mobilisiert, der eine gezielte Reparatur des Doppelstrangs ermöglicht. Mit der Site Directed Nuclease-2 (SDN-2) Technik werden kleinere gerichtete DNA-Abschnitte verändert und mit der Site Directed Nuclease-3 (SDN-3) Technik werden größere gerichtete DNA-Stücke in den Zielorganismus eingebracht.

Bei dem HDR Reparaturmechanismus werden kurze, synthetische DNA-Abschnitte hergestellt, die gemeinsam mit dem CRISPR/Cas-System in die Zelle eingebracht werden. Diese synthetisierten DNA-Sequenzen sind homolog mit der Zielsequenz in der Pflanzen-DNA bis auf die geänderten Basen, die später die gewünschte neue Eigenschaft hervorrufen sollen. Diese zusätzlich eingeführten DNA-Stücke stellen die Reparaturvorlage für den Bereich des erzeugten Doppelstrangbruches dar. Diese Reparaturvorlage wird von den Reparaturmechanismen der Zelle identifiziert und an die Stelle des Doppelstrangbruches eingebaut. HDR-Reparaturen können ausschließlich in einer Zellzyklusphase den Einbau von DNA-Vorlagen gewährleisten, weshalb SDN-2 und SDN-3 Techniken weniger effizient als die SDN-1 Technik angesehen werden (Dima et al., 2020, p., 17-19).

HDR ist spezifisch mit der CRISPR/Cas-Technologie verbunden und basiert auf einem ähnlichen Prinzip, wie der bereits erläuterten ODM. Obwohl CRISPR/Cas zu dem Genome Editing Ansatz der SDNs gehört und Doppelstrangbrüche hervorruft, wird das Ergebnis des SDN-2 Verfahrens oft mit dem ODM-Verfahren verglichen und gleichgesetzt, da beide

Verfahren neben der Zielsequenz ebenfalls die DNA-Vorlage vorgeben, um gezielte Mutationen hervorzurufen (siehe: Kapitel: Genome Editing).

3.9. Herstellungsanleitung eines synthetischen CRISPR/Cas-Komplexes

Nachstehend ist eine Schritt-für-Schritt-Anleitung dargestellt, in der aufgeführt wird, was für die Herstellung eines CRISPR/Cas-Komplexes unter Laborbedingungen erforderlich ist, um anschließend in eine Pflanzenzelle eingebracht zu werden.

Vorbereitung der CRISPR/Cas-Komponenten:

Herstellung der Guide-RNA

Eine synthetisch hergestellte gRNA wird entwickelt und auf dessen Reinheit überprüft. Sie ist spezifisch zu der DNA-Sequenz in der Pflanzenzelle, die verändert werden soll. Für gewöhnlich besteht die gRNA aus zwei Komponenten.

Für die strukturelle Stabilität der gRNA ist die „scaffold RNA“ zuständig, die als eine Art Korpus für einen weiteren RNA-Teil bietet, der den bereits angesprochenen Spacer, die Ziel-Sequenz, die in der Pflanze anvisiert werden soll, trägt. Die Herstellung der gRNA erfolgt in der Regel mit einer in-vitro-Transkriptionstechnik, wobei von einer DNA-Vorlage Gebrauch gemacht wird. Sie enthält die Sequenz der gRNA. Die Vorlage wird mittels einer RNA-Polymerase in die benötigte gRNA-Sequenz transkribiert (C. Li et al., 2023, p. 108-115).

Bereitung des Cas9-Proteins

Es gibt zwei Möglichkeiten das Cas9-Protein für die Herstellung eines künstlichen CRISPR/Cas-Systems zu gewinnen. Es kann aus natürlichen Quellen isoliert- oder durch rekombinante DNA-Technologie hergestellt werden.

Bei der rekombinanten Herstellung von Cas9-Proteinen wird das Cas9-Gen in eine adäquate *Expressionsplasmid-DNA* befördert, die wiederum in einen Wirt, wie *E. coli*, transformiert wird. Transformierte Zellen produzieren das Cas9-Protein, indem das entsprechende Gen exprimiert wird. Produzierte Zellen werden anschließend geerntet. Das Cas9-Protein wird isoliert und gereinigt (Shilling et al., 2020, 1-8).

Kultivierung von Pflanzenzellen:

Pflanzenzellen werden in einer sterilen Umgebung (sterile/s Werkzeug, Gefäße, Arbeitsweisen) kultiviert und auf einem geeigneten Wachstumsmedium inkubiert.

Die Pflanzenzellen werden hierfür aus den Pflanzen gewonnen, die eine genetische Veränderung erfahren sollen. Dafür werden zum Beispiel kleine Gewebestücke (Blätter, Stängel, Wurzel) entfernt, die lebende Zellen enthalten. Die Kultivierung von Pflanzenzellen erfordert geeignete Wachstumsmedien, die aus Nährlösungen bestehen und alle notwendigen Nährstoffe für das Überleben und Wachstum der Pflanzenzellen enthalten. Die Nährmedienrezeptur ist immer spezifisch auf den Organismus zugeschnitten. Die Pflanzenzellen werden in das Wachstumsmedium gegeben und in einem Inkubator, der optimale Temperatur-, Luftfeuchtigkeits- und Lichtverhältnisse bietet inkubiert. Während der Inkubationszeit wird je nach Bedarf das Wachstumsmedium ergänzt oder ausgetauscht.

Transfektion der Pflanzenzellen:

Der CRISPR/Cas-Komplex wird in die Pflanzenzellen übertragen. Hierfür werden je nach Pflanzenart unterschiedliche Techniken verwendet (siehe auch: Methoden zum Einbringen des CRISPR/Cas-Systems in die Pflanzenzelle).

Um festzustellen, dass der CRISPR/Cas-Komplex erfolgreich in die Pflanzenzellen eingebracht wurde, ist es erforderlich die Effizienz der Transfektion zu kontrollieren. Dafür gibt es unterschiedliche Analysen der Genomsequenz, wie zum Beispiel PCR, die durchgeführt werden (Matissek & Fischer, 2021, p. 320-326).

Kultur und Selektion:

Die bestätigten und transfizierten Pflanzenzellen werden unter sterilen Bedingungen und mit dem auf den Organismus zugeschnittenen Kulturmedien fortlaufend kultiviert, um ein weiteres Wachstum sowie eine weitere Vermehrung der Pflanzenzellen zu gewährleisten. Es gibt unterschiedliche Selektionsmethoden, um die Zellen zu identifizieren, die den CRISPR/Cas-Komplex erfolgreich aufgenommen haben. In manchen Fällen ist es nach wie vor sinnvoll Markergene, wie sie in der Grünen Gentechnik verwendet werden, einzusetzen. Das am häufigsten verwendete Markergen ist das Antibiotikaresistenz-Gen. Sie werden gemeinsam mit dem CRISPR/Cas-Komplex eingeführt und geben den mit CRISPR/Cas enthaltenen Zellen zusätzliche Merkmale oder verleihen den Zellen Resistenzen gegenüber speziellen Substanzen. So werden die transfizierten Pflanzenzellen zum Beispiel auf einen Nährboden, der ein Antibiotikum enthält, gegeben. Alle erfolgreich transfizierten CRISPR/Cas-Zellen tragen das Markergen, überleben somit auf dem Antibiotika-Nährmedium und vermehren sich problemlos. Pflanzenzellen, die kein Markergen tragen, werden selektiv ausgesondert, indem sie durch das Antibiotikum oder eine andere entsprechende

Substanz, die mit dem Markergen korreliert, abgetötet werden. Zugleich ist es möglich auf den Einsatz von Markergenen bei CRISPR/Cas zu verzichten, indem ein Gen oder eine Sequenz eingebracht wird, die nicht auf Antibiotika oder chemische Selektionsmittel zurückgreift, wie zum Beispiel: Fluoreszierende Proteine (Yue et al., 2020, p. 1-9).

Bestätigung der Editierung:

Im Anschluss an die Kultur und Selektion der transfizierten Pflanzenzellen ist es wichtig, die an den Pflanzenzellen durchgeführte Genom-Editierung zu bestätigen.

Eine immer noch weit verbreitete Methode zur Bestätigung der Editierung ist die Sanger-Sequenzierung (kettenabbruchverfahren), um herauszufinden, ob die gewünschte Veränderung, durch zum Beispiel Insertion oder Deletion der DNA-Sequenz stattfand.

Hierbei werden die spezifischen DNA-Regionen, die das Ziel der Genom-Editierung sind, durch PCR (Polymerase-Kettenreaktion) amplifiziert (vervielfältigt) und dann für die Sequenzierung in vier separate Reaktionen aufgeteilt, die entweder Adenin, Thymin, oder Guanin enthalten. Durch zufällige Unterbrechungen der DNA entstehen verschiedene Längen, die an unterschiedlichen Positionen enden und für das Gesamtergebnis kombiniert werden. Die erhaltenen DNA-Sequenzen werden mit der Referenzsequenz verglichen (J. Kurreck et al., 2022, p.866-867).

Die Untersuchung von Reinheit und der Bestätigung des Editierens kann ebenfalls durch die Methode der Gel-Elektrophorese erfolgen. Sie dient der Analyse und der Identifizierung von DNA-Fragmenten, die durch die Genom-Editierung verursacht wurden. Hierbei spielen Merkmale wie Größe und Struktur der DNA eine Rolle. Die Methode findet wieder häufiger Anwendung durch das Aufkommen der CRISPR/Cas Technologie, bei der lange CRISPR/Cas Ziel-Stränge verwendet werden. Weitere Nachweisverfahren für die Bestätigung der Genom-Editierung wären die quantitative PCR (qPCR) (J. Kurreck et al., 2022, p.804, 839) oder T7E1-Assay.

In der Regenerationsphase werden die Pflanzenzellen in ein geeignetes Medium gebracht, sodass sich vollständige Pflanzen ausbilden können, die im Stande sind die Bedingungen in Gewächshäusern zu überdauern.

3.9.1. Beispiel CRISPR/Cas Integration in eine Tomatenpflanze

In vielen Studien zur Anwendung von CRISPR/Cas wird festgestellt, ob die genetische Veränderung in der Ziel-DNA der Pflanzenzellen homozygot oder heterozygot erfolgte. Allgemein werden diese Verfahren als Genotypisierungsverfahren bezeichnet, worunter die Allel-spezifische PCR (AS-PCR), das TaqMan-Assay, Tracking of Indels by DEcomposition (TIDE_Assay) oder Next-Generation-Sequencing fallen (J. Kurreck et al., 2022, p. 870).

Das folgende Fließdiagramm zeigt den schematischen Ablauf, um Mutationen in einer bestehenden Pflanzenzelle hervorzurufen am Beispiel einer Tomatenpflanze, bei der sich durch eine spezifische Sequenz-Veränderung, die Pflanzenarchitektur sowie die Frucht- und Reifeentwicklung optimieren soll.

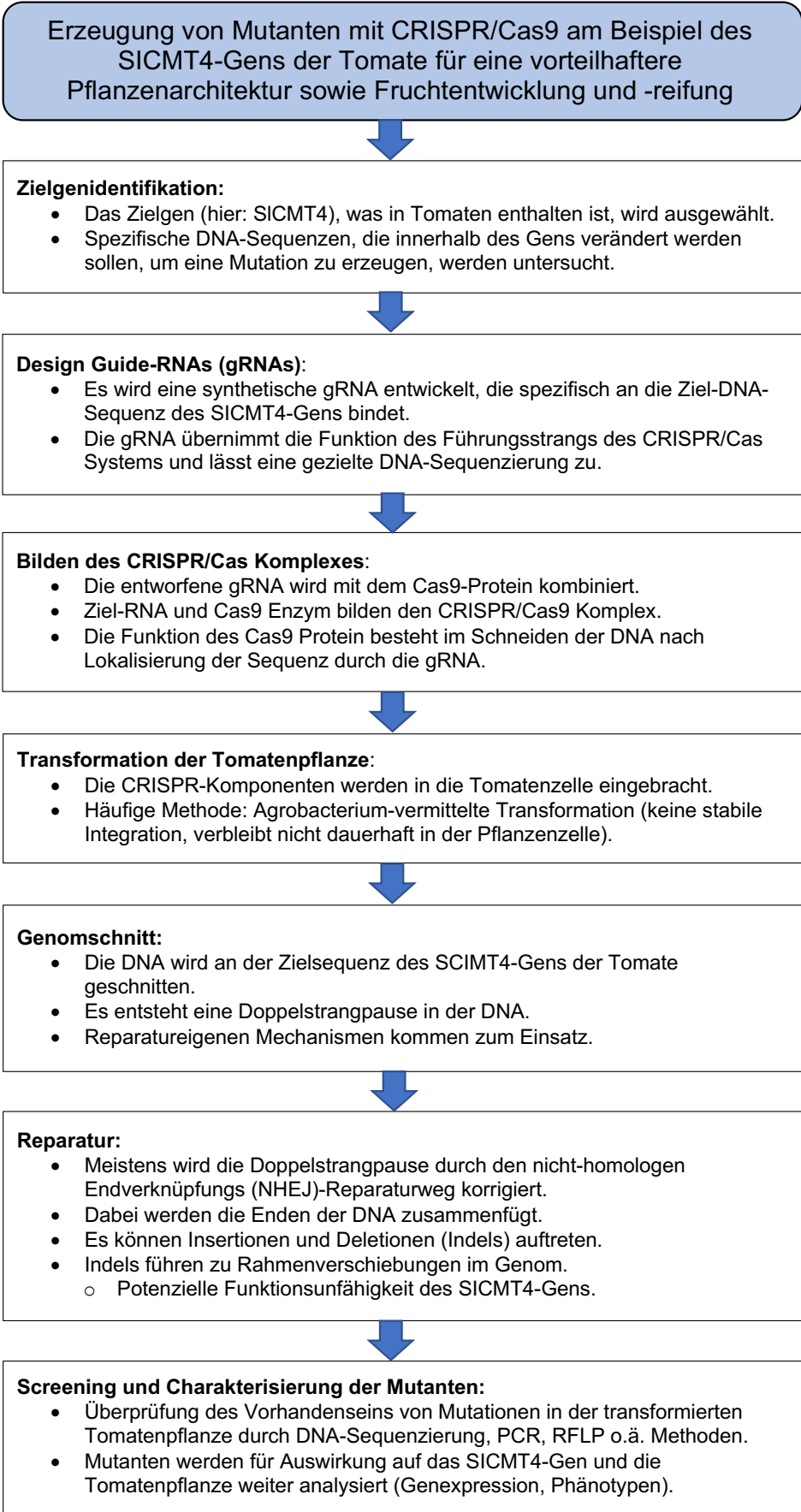


Abbildung 7: Tomatenmutation durch CRISPR/Cas mit SICMT4

3.10. Lebensmittelbezogene Schlüsselbegriffe

Nachstehend werden Begriffe, die ausschließlich im Titel integriert sind definiert.

3.10.1. Landwirtschaftliche Nutzpflanzen

Zu landwirtschaftlichen Nutzpflanzen zählen alle Pflanzenarten, die für den Menschen einen „Nutzen“ darstellen, verwertet werden und somit einen ernährungsphysiologischen Gewinn erbringen. Nutzpflanzen werden sowohl als Nahrungs- und Genussmittel, für die Nutztierhaltung als auch für technische Zwecke, wie der Bionik (nachwachsende Rohstoffe) verwendet. Zu den Nutzpflanzen zählen in erster Linie Kultur- und Wildpflanzen. Es existieren ca. 250.000 Pflanzenarten weltweit, wovon 30.000 für den menschlichen Verzehr geeignet sind. Dennoch weisen ausschließlich ca. 150 Nutzpflanzen wirtschaftliche Relevanz auf und 30 von diesen Pflanzensorten machen 90% des gesamten Nahrungsbedarfs weltweit aus (Ziegler & Senser, 2023, Abs. 1-6).

3.10.2. Obstkulturen

Obstkulturen werden in speziellen Plantagen oder teilweise Unterglasanbau kultiviert (Knoop & Otter, 2019, p. 108-112). Sie unterscheiden sich von Nutzpflanzen hauptsächlich hinsichtlich der Produktion von essbarem Obst und somit von dem zu verzehrenden Bereich der Pflanze. Der Ertrag aus Obstkulturen ist primär für den direkten, rohen Verzehr oder für wenige, kleine Weiterverarbeitungsschritten bestimmt. Landwirtschaftliche Nutzpflanzen hingegen bieten ein größeres Verwendungsspektrum und werden auf Feldern und Äckern angebaut (Rimbach et al., 2015, p.207).

3.10.3. Kartoffel

Die Kulturkartoffel ist eine der wichtigsten Grundnahrungsmittelpflanzen weltweit, was sich an einem Prokopf-Verzehr des Wirtschaftsjahres 2021/2022 von 56,1kg widerspiegelt (BLE, 2022). Die wissenschaftliche Bezeichnung der Kartoffel ist: *Solanum tuberosum* (*S.tuberosum*). Sie zählt zu der Gattung Nachtschatten (*Solanum*) und gehört zu der übergeordneten Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*). Die Kartoffel ist deshalb mit Tomate, Paprika und Tabak verwandt. Sie sind von Natur aus Unkraut anfällig und es ist herausfordernd, die Bestände vor speziellen Pilzkrankheiten, wie der Kraut- und Knollenfäule hinreichend zu schützen. Fungizide stellen meistens die sicherste Bekämpfung dar. Kartoffeln unterteilen sich in Speise- und Wirtschaftskartoffeln, wobei Wirtschaftskartoffeln für die industrielle Herstellung von Stärke- und Alkoholerzeugnissen verwertet werden (Raupp, 2017, p. 65-66). Der Ernährungsphysiologische Wert der Kartoffel ergibt sich durch das hochwertige Kartoffeleiweiß (essenzielle Aminosäuren) sowie dem Mikronährstoff

Kalium. Sie sind reich an B-Vitaminen und an Vitamin C. Die Kartoffelpflanze besitzt einen hohen Anteil an Flavonoiden und Anthocyanen, die eine entzündungshemmende Wirkung haben sollen, den Blutzuckerspiegel senken und die körperliche Immunreaktion effektiv beeinflussen können (Rösch et al., 2019, Abs. 1-2).

Genetische Merkmale der Kartoffel

Das Kartoffelgenom wurde 2011 vollständig entschlüsselt (Xu et al., 2011, p. 189-193). Es umfasst rund 40.000 Gene. Die Anzahl der Chromosomen in den Zellen von Kartoffelpflanzen, wird wie bei allen anderen Organismen, durch die Begriffe *diploid* und *tetraploid* beschreiben. Die meisten kommerziell erhältlichen Sorten sind *tetraploid* und besitzen 48 Chromosomen. Sie werden häufig als „Hauptfruchtsorten“ bezeichnet und sind im Kartoffelanbau oft vertreten. Der Unterschied zwischen *diploiden* und *tetraploiden* Kartoffelsorten besteht darin, dass tetraploide Sorten zu größeren Knollen neigen und resistenter gegenüber Pathogenen sind. Pflanzenmerkmale, wie Ertrag, und Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Umweltbedingungen spielen auch eine Rolle, weshalb tetraploide Sorten im kommerziellen Kartoffelanbau häufiger anzutreffen sind (Rösemann, 2020, p. 457-458).

In der Grundlagenforschung und während der Eigenschaftenverbesserung durch traditionelle Mutagenese oder Kreuzung sind tetraploide Kartoffeln nicht leicht zu handhaben. Die Veränderung spezifischer Gensequenzen und der zusammenhängenden Genfunktionen werden durch die Etablierung und Anwendung von CRISPR und des CRISPR assoziierten Proteins deutlich vereinfacht (González et al., 2023, p. 333-361).

3.10.4. Tomate

Botanisch gesehen handelt es sich bei Tomaten um eine Frucht, genauer, um eine Beerenfrucht. Sie kann als Teil von Obstkultur betrachtet werden (aus befruchteter Blüte entsteht die Frucht), obwohl sie im allgemeinen Sprachgebrauch und in der kulinarischen Einteilung für gewöhnlich als Gemüse bezeichnet wird. Widersprüche in botanischen und kulinarischen Eigenschaften lassen die Bezeichnung: Fruchtgemüse zu (Rimbach et al., 2015, p. 207).

Diese Arbeit richtet sich tendenziell nach der botanischen Einteilung, da der Fokus in der Unterscheidung von Arten liegt und auf der Verbesserung von Tomatenpflanzeigenschaften sowie auf adäquateren Anbau- und Erntebedingungen beruht. Der wissenschaftlicher Name lautet *Solanum lycopersicum* und gehört, wie die Kartoffel zu der Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) (Kumar et al., 2020, p. 191-197). Zwischen dem Jahr 2021 und 2022 stellte die Tomate mit einem Prokopf-Verzehr von rund 30kg pro Jahr

(BLE, 2023) in Deutschland das Lieblingsgemüse dar. Für den kommerziellen Vertrieb wird die Tomate hauptsächlich in Mitteleuropa durch Unterglasanbau hergestellt. Die Hauptproduzenten sind jedoch nach wie vor China und Indien (Statista, 2023).

Der ernährungsphysiologische Wert der Tomate stützt sich auf den Vitamingehalt, den enthaltenen Mikronährstoffen sowie sekundären Pflanzenstoffe, wie Flavonoide. Dem Carotinoid Lycopin, welches ebenfalls zu den sekundären Pflanzenstoffen zählt, wird eine positive Auswirkung auf den menschlichen Organismus zugesagt (Rösch, 2023, Abs. 1-5).

Genetische Merkmale der Tomate

Das Tomatengenom wurde im Jahr 2012 entschlüsselt. Es besitzt 12 diploide Chromosomenpaare und besteht aus rund 35.000 Genen. Die biologische Funktion einzelner Gene konnte identifiziert und funktionelle Gruppen zugeordnet werden. Sofern bekannt ist, welche Gene spezielle Prozesse steuern, ist die Expression wünschenswerterer Pflanzeigenschaften in der Züchtung möglich. Die domestizierte Tomate unterscheidet sich lediglich um 0,6% von dem ursprünglichen Wildtyp. Es ist anzunehmen, dass diese Tatsache auf die frühe Domestikation im 16. Jahrhundert zurückzuführen ist. Die Kartoffel und die Tomate besitzen insgesamt 18.320 orthologe (homologe) Genpaare (Sato et al., 2012, p. 635-637).

4. Methoden

Es werden zwei Methoden angewendet, um die beiden Teilbereiche der Forschungsfrage umfassend zu beantworten. Bei der ersten Methode handelt es sich um eine funktionale systematische Literaturrecherche, die zur Darstellung der unterschiedlichen Anwendungsfelder von CRISPR/Cas in der Pflanzenzüchtung eingesetzt wird. Dafür werden die beiden landwirtschaftlichen Produkte Kartoffeln und Tomaten näher betrachtet. Die zweite Methode stellt die Durchführung von Interviews dar, um neben den Anwendungsbereichen auch die zukünftige Bedeutung von CRISPR/Cas abdecken zu können. Dies erfolgt unter Berücksichtigung von Themen, wie Lebensmittelsicherheit, Risiko- und lebensmittelrechtliche Bewertung.

4.1. Methode 1: Systematische Literaturrecherche

Die systematische Literaturrecherche legt den Fokus auf Anwendungsbereiche von CRISPR/Cas in der Landwirtschaft. Der Schwerpunkt liegt bei züchterischen Überlegungen, inwieweit CRISPR/Cas durch genetische Veränderungen des Pflanzengenoms bestmöglich eingesetzt werden kann, um der Agrarwirtschaft zu innovativeren Lösungen zu verhelfen. Hierzu werden ausschließlich die Lebensmittelbeispiele Kartoffeln und Tomaten in die Suchstrategie mitaufgenommen. Für die Recherche werden Datenbanken, wie PubMed, Science Direct, Scopus und Wiley Library eingesetzt.

Zusammenhängende und relevante Themen, die CRISPR/Cas umgeben werden in der systematischen Literaturrecherche nicht berücksichtigt. Die verwendete Literatur ist größtenteils in englischer und vereinzelt in deutscher Sprache. Der Erhebungszeitraum beläuft sich auf Dezember 2022 bis Mai 2023. Die nachfolgende Suchstrategie hat zu insgesamt 6.183 Publikationen geführt.

4.1.1. Suchstrategie

Nachfolgende Schlagworte sind mit bool'schen Operatoren für die Suchstrategie in den Datenbanken angewendet worden.

PubMed:

```
("CRISPR" OR "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats"[Mesh] OR "CRISPR-Associated Proteins"[Mesh] OR "CRISPR-Cas Systems"[Mesh] OR "RNA, Guide, CRISPR-Cas Systems"[Mesh] OR "CRISPR-Associated Protein 9"[Mesh]) AND "Solanum lycopersicum"[Mesh] OR ("Solanum tuberosum"[Mesh])
```

Limitation: 2018-2023

Science Direct:

("Genome Editing" OR "CRISPR" OR "CRISPR/Cas" OR "CRISPR-Associated) AND ("Tomato" OR "Solanum lycopersicum" OR "potato" OR "Solanum tuberosum")

Limitation: 2018-2023

Scopus:

("CRISPR" OR "CRISPR/Cas" OR "CRISPR-Cas System" OR "CRISPR/Cas9" OR "CRISPR/Cas9 System" OR "Genome Editing" OR "Gene Editing" OR "Prime Editing") AND ("potato" OR "solanum lycopersicum" OR "tomato" OR "solanum tuberosum") (Article title, Abstract, Keyword)

Limitation: 2018-2023

Wiley Library:

("CRISPR" OR "CRISPR/Cas") AND ("Plant breeding" OR "Agriculture" AND "Tomato" OR "Potato")

Limitation: 2018-2023

Einschluss- und Ausschlusskriterien

Alle Publikationen werden in den Datenbanken auf die letzten 5 Jahre eingegrenzt. Das entspricht aktuell dem Zeitraum von 2018 bis 2023.

Da sich die Recherche auf Anwendungsbereiche in der Pflanzenforschung hinsichtlich Kartoffeln und Tomaten fokussiert, werden Publikationen eingeschlossen, die sich auf folgende züchterische Eigenschaften beziehen, die mit CRISPR/Cas verändert und optimiert werden sollen. Hierbei stehen Parameter, wie Pflanzenarchitektur, Ertrag, (Frucht-) Qualität/Reife, Haltbarkeit, Reduktion toxischer Inhaltsstoffe, Pathogenresistenz, Nährwert, Geschmack, Ernährung und abiotische Belastung im Zentrum des Forschungsgegenstandes. Es erfolgte keine länderspezifischen Studieneingrenzung, sodass die Studienübersicht global zu bewerten ist.

Ausschlusskriterien umfassen Literatur vor dem Jahr 2018 sowie alle Publikationen, die keinen direkten Lebensmittelbezug aufweisen und somit keinen Schwerpunkt auf der biotechnologischen Umsetzung angepasster Pflanzeigenschaften der genannten Lebensmittel haben.

4.1.2. Auswertungsstrategie

Das Screening der Publikationen erfolgt über Titel-, Abstract- und Volltextermittlung, wie im Ergebnisteil dem Fließdiagramm der eingeschlossenen Studien zu entnehmen ist. Das „Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses“ (PRISMA) Diagramm ist ein schematische Grundkonzept für systematische Literaturrecherchen zur Identifikation von Publikationen, dem Screening von Literatur bis zu der Festlegung von eingeschlossenen Publikationen. Dabei werden die genannten Themenbereiche (siehe: Ein- und Ausschlusskriterien) sowie die Lebensmittel Kartoffel und Tomate im Hinblick auf das CRISPR/Cas-System primär im Titelscreening berücksichtigt. Im Abstract geben detailliertere Informationen darüber Aufschluss welche Gene oder Stoffwechselwege in Kartoffeln und Tomaten von Bedeutung sind, um mit CRISPR/Cas vermittelte Genomveränderungen zu induzieren. Anhand dessen wird die Auswahl des Volltext-Screenings getroffen.

Die Daten werden systematisch organisiert, indem sie festgelegten Themenbereichen, wie zum Beispiel „Pathogenresistenz“, „Fruchtqualität“ oder „Nährwert“ im Ergebnisteil der Literaturrecherche zugeordnet und gesammelt dargestellt werden.

4.2. Methode 2: Experteninterviews

Neben der systematischen Literaturrecherche werden drei Interviews durchgeführt, mit dem Ziel, die umfangreiche Sachkenntnis von Wissenschaftlern zum übergeordneten Thema des aktuellen Standes und der zukünftigen Bedeutung von CRISPR/Cas zu integrieren. Hierzu gehören Teilthemen wie der Einschätzung der Lebensmittelsicherheit und der rechtlichen Beurteilung von mit CRISPR/Cas hergestellten Pflanzen und daraus weiterverarbeiteten Produkten. In diesem Zusammenhang werden die Lebensmittelbeispiele Kartoffel und Tomate ebenfalls angesprochen. Die Interviewergebnisse sollen nach der Ergebnisdarstellung in der Diskussion untereinander und mit den Literaturergebnissen verglichen und analysiert werden.

In dieser Arbeit fällt die Wahl auf die Interviewform des qualitativen Experteninterviews. Es ist semistrukturiert und leitfadengestützt.

4.2.1. Das Leitfadengestützte Experteninterview

Bei einem Experteninterview handelt es sich für gewöhnlich um ein Leitfadeninterview. Sie sind ein anerkanntes Instrument, um qualitative Daten differenziert und methodisch zu produzieren. Ein im Vorfeld erarbeiteter Leitfaden gestaltet und unterstützt den Interviewablauf. Die Interviewpartner kennen in der Regel den thematischen Rahmen des Interviews und die dahinterstehende Systematik.

Ein Leitfaden enthält in der Regel optionale Elemente, wie (Erzähl-) Anforderungen, speziell formulierte Fragen sowie Stichpunkte für frei formulierte Fragen. Methodologisch gewährleistet der Leitfaden immer eine größtmögliche Offenheit, um alle potenziellen Äußerungen zuzulassen.

Experteninterviews charakterisieren sich darüber hinaus durch eine gezielte Auswahl der Interviewpartner auf Grundlage des beruflichen Status. Das Forschungsinteresse gilt größtenteils dem informations-, praxis- und erfahrungsbezogenen sowie technischen Wissen. Die Wissensbereiche, die für das Interview vorgesehen sind, werden thematisch qualitativ voll eingegrenzt und die Daten als faktische Befunden ausgewertet.

Für die Auswertung von qualitativen Daten müssen die Ergebnisse in Textform vorliegen. Das gilt ebenfalls für das Experteninterview, bei dem der Text durch die Kommunikationssituation während des Interviews interaktiv entwickelt wird (Helfferich, 2022, p. 175-179).

4.2.2. Auswahl der Experten

Die Wahl der Interviewpartner fällt auf Experten, die in der Pflanzenforschung- und an unterschiedlichen Instituten und/oder Universitäten tätig sind. In ihren Funktionen besitzen sie neben dem wissenschaftlichen Know-how, alle einen züchterischen Praxisbezug und sind somit in der Lage die potenzielle Anwendung von CRISPR/Cas in der europäischen Landwirtschaft mit einem erweiterten Blick fundiert einschätzen zu können. Nachfolgend werden die Experten vorgestellt:

Dr. Stefan Weigl ist akademischer Rat an der Universität Münster und am Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen beschäftigt.

Dr. Jochen Kumlehn ist vom Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben und leitet die Arbeitsgruppe „Pflanzliche Reproduktionsbiologie“. Darüber hinaus leitet er die Division „Zellbiologie und Biotechnologie“, die aus zwei Arbeitsgruppen besteht.

Dr. Detlef Weigel ist Direktor des Max-Planck-Instituts für Biologie in Tübingen. Zudem ist er Consultant von Züchtungsfirmen, unter anderem von deutschen Saatgutherstellern.

Die Kontaktvermittlung erfolgte über Prof. Dr. Béthune.

Alle Interviews finden online via Zoom statt und müssen mit einer Einwilligungserklärung für die Verwendung des produzierten Materials bestätigt werden, siehe Anhang II: Einwilligungserklärung.

4.2.3. Vorbereitung-Entwicklung des Interviewleitfadens

Im Vorfeld wird ein allgemeingültiger Leitfaden entwickelt, der den Experten mit Informationen zum allgemeinen Ablauf zur Verfügung gestellt wird. Der Leitfaden besteht aus Hauptfragen, die zuerst gestellt werden. Je nach Resonanz und Eigeninitiative des Experten folgen daraufhin zu der Hauptfrage passende Unterfragen. Ziel ist es das Interview durch den Leitfaden themenorientiert zu gestalten, ohne eine größtmögliche Offenheit seitens der Interviewpartner zu verhindern/einzuschränken. Es wird ein Interviewleitfaden für alle Interviews entworfen, siehe: Anhang II: Interviewleitfaden. Somit sind die einzeln geführten Interviews durch die ähnliche Erhebungssituation untereinander vergleichbar.

Die allgemeine Vorgehensweise bei der Erstellung von Haupt- und Unterfragen für Interviewleitfäden erfolgt gemäß Helferich, 2022 wie folgt:

- a. Sammlung von potenziellen Fragen
- b. Prüfung der gesammelten Fragen
- c. Sortierung der Fragen
- d. Subsumieren der Fragen

Zu Beginn wird eine Sammlung an Fragen erstellt, die sich allgemein auf den Forschungsgegenstand beziehen. In einem weiteren Schritt werden die Interviewfragen geprüft und kritisch hinterfragt, ob diese hinreichend bedeutsam für die zu untersuchenden Inhalte sind. Fragen, die keinen direkten Bezug zu CRISPR/Cas in der Pflanzenzüchtung haben, werden gestrichen oder im besten Fall gesondert gesammelt. Die verbleibenden und geprüften Fragen werden gemäß der thematischen Zusammengehörigkeit und entsprechender Frage- richtung selektiert und zusammengefasst. Aus diesen entstandenen Themenbereichen werden jeweils Hauptfragen formuliert. Weitere Fragen, die die Hauptfrage nur bedingt wieder spiegeln oder ergänzen werden als Unterfragen aufgeführt (Helferich, 2022, p.881-884).

4.2.4. Interviewdurchführung

Nach der Begrüßung wird der Ablauf, die eingeplante Dauer und die Datenschutzvereinbarung des Interviews erneut erläutert und das Einverständnis nach Starten der Aufnahme- funktion über Zoom mündlich eingeholt. Das Thema wird seitens des Interviewers kurz skiz- ziert. Anschließend folgt eine Einstiegsfrage zur Person, dem Tätigkeitsfeld und der Ver- knüpfung zu CRISPR/Cas. Im Hauptteil des Interviews wird der Interviewleitfaden abgear- beitet. Nach Beantwortung der letzten Frage wird das Interview vom Interviewer

zusammengefasst und dem Interviewpartner die nächsten Schritte mitgeteilt. Es folgt die Danksagung für die Teilnahme mit anschließender Verabschiedung.

4.2.5. Methode zur Auswertung der Experteninterviews

Für die Auswertung der qualitativen Interviewergebnisse wird eine induktive Inhaltsanalyse nach Mayring angewendet. Sie ist hilfreich, um die Analyse großer Textmengen mit inhaltsanalytischen Regeln systematisch und überprüfbar zu machen. Die leitfadengestützten Interviewdaten werden paraphrasiert, indem irrelevante Textbestandteile gestrichen werden.

Es gibt zwei grundlegende inhaltsanalytische Interpretationsregeln, die einerseits die Festlegung der Kategoriendefinition und andererseits die Festlegung des Abstraktionsniveaus umfassen.

Kategoriendefinition

Bei der Kategoriendefinition wird festgelegt, auf welche Muster oder auf welche Informationen in den Interviews geachtet werden soll:

- Alle Aussagen der Experten zu dem aktuellen Stand und der zukünftigen Bedeutung von CRISPR/Cas werden eingeschlossen.
- Alle Aussagen zu Anwendungen der Technologie bei Kartoffel und Tomate werden eingeschlossen.
- Alle zusammenhängenden Themen, wie Lebensmittelsicherheit und rechtliche Beurteilung werden eingeschlossen.
- Alle weiteren relevanten Themen, die sich nicht explizit auf die Anwendungsbeispiele beziehen werden im Rahmen der Diskussion berücksichtigt.

Kategorien, die für die Beantwortung der Fragestellung und somit aus der Kategoriendefinition rausfallen, werden nicht berücksichtigt. Aufbauend auf die Kategoriendefinition entstehen die induktiven Kategorien. Bei der induktiven Inhaltsanalyse werden die Kategorien direkt aus den Rohdaten der Interviewergebnisse gebildet und in mehreren Durchläufen zu ähnlichen Kategorien zusammengefasst und schrittweise einer Hauptkategorie zugeordnet. Erkenntnisse und Muster werden somit aus den Daten selbst abgeleitet, wobei die im Interviewleitfaden vorbereiteten Hauptfragen als Orientierung dienen.

Das induktive Verfahren arbeitet demnach mit den gebildeten Kategorien weiter und sorgt durch die schrittweise Gruppierung der Kategorien zu Hauptkategorien für die Erhöhung des Abstraktionsniveaus (Mey & Mruck, 2010, p. 601-606).

Festlegung Abstraktionsniveau

Bei der Festlegung des Abstraktionsniveaus geht es darum, wie detailliert oder wie allgemein die gewonnenen Informationen ausgewertet werden sollen. Bei einem niedrigen Abstraktionsniveau würden ausschließlich sehr spezifische Textbestandteile analysiert werden. Das Abstraktionsniveau steigt, indem nach übergeordneten Mustern und größeren Zusammenhängen analysiert wird, was durch die Zusammenführung der vorliegenden Interviewergebnisse der Fall ist.

Für das Bilden von induktiven Kategorien muss das Abstraktionsniveaus schrittweise angehoben werden. Hierbei bedarf es (häufig) mehrerer Reduktionen, bevor eine paraphrasierte Aussage, zu einer aussagekräftigen Kategorie führt (John, 2021, p. 73-75, 181-182). In dieser Arbeit ergibt sich ein hohes Abstraktionsniveau, da die Fragestellung mehrere Teilgebiete und Unterthemen abdeckt, die im Gesamtkontext analysiert werden müssen. Aus diesem Grund weisen die Kategorien einen allgemeineren Charakter auf.

Festlegung der Analyseeinheiten

Die Analyseeinheiten ermöglichen eine systematische und strukturierte Betrachtung der Ergebnisse auf unterschiedlichen Analyse-Ebenen. Die induktive Inhaltsanalyse unterteilt die Analyseeinheiten in Kodier-, Kontext- und Auswertungseinheit:

Kodiereinheit:

Bei der Kodiereinheit handelt es sich um kleine Einheiten aus dem Textmaterial (Wort, Satz, Absatz), die in die Analyse mitaufgenommen werden sollen. Sie werden gemäß der Kategoriendefinition kodiert (kategorisiert).

Kontexteinheit:

Die Kontexteinheit stellt die nächsthöhere Ebene der Analyse dar. Sie setzt die einzelnen Kodiereinheiten in den Zusammenhang des jeweiligen Interviews. In dieser Arbeit ist die Kontexteinheit somit das einzelne Interview. Es werden nicht die einzelnen Kodiereinheiten betrachtet, sondern wie sie im Gesamtkontext der Interview-Daten stehen.

Auswertungseinheit:

Die Auswertungseinheit stellt die größte Analyseebene dar und bezieht sich in diesem Fall auf die Kontexteinheiten von allen drei geführten Experteninterviews.

Aus der interviewübergreifenden Kategorienbildung entsteht mit Hilfe der strukturgebenden Analyseeinheiten ein finales Kategoriensystem aus allen gebildeten, für den Ergebnisteil relevanten Kategorien. Diese Kategorien stehen in Zusammenhang mit den einzelnen

Textpassagen aus den drei Interviews (Mayring & Fenzl, p. 2019, 642-643). Die Entwicklung der ergebnisorientierten Kategorienbildung kann im Anhang II: Entwicklung der Kategorienbildung eingesehen werden. Alle drei Resultate der Experteninterviews werden in einem zusammenhängenden Ergebnistext pro finaler Kategorie abgebildet. Der entstandene Ergebnistext ist Gegenstand der zusammenfassenden Inhaltsanalyse.

Jedes der drei Interview-Transkripte ist mit Zeilennummern versehen, sodass im Anhang III: Interviewtranskripte die exakten Interviewpassagen ausfindig gemacht und nachvollzogen werden können, welche originalen Textstellen zu den entsprechenden finalen Kategorien geführt haben.

5. Ergebnisse

Die Ergebnisse gliedern sich in zwei Bereiche auf. Erstens in die Ergebnisse der Literaturrecherche, die nachfolgend als Literaturübersicht dargestellt sind und zweitens in die Ergebnisse der Interviews, die als Erkenntnisse aus den Experteninterviews in der Gliederung zu finden sind. Die Literaturübersicht beginnt mit der Übersicht von aktuellen Forschungsprojekten, die von Wirtschaftsunternehmen vorangetrieben werden. Der Fokus der Literaturübersicht liegt auf den möglichen Modifikationen von Pflanzeigenschaften durch das CRISPR/Cas-System. Diese Anwendung wird anhand der Lebensmittelbeispiele Kartoffel und Tomate skizziert. Anschließend wird die Gesetzeslage hinsichtlich genomeditierter Produkte in Europa anhand eines Fließschemas dargestellt und erläutert. Die Interviewergebnisse bestehen aus vier thematisch unterteilten Ergebnisteilen: Aktueller Stand und zukünftige Bedeutung, lebensmittelbezogene Anwendungsbeispiele, Lebensmittelsicherheit und rechtliche Beurteilung.

5.1. Literaturübersicht

Zu Beginn stellt das folgende Fließdiagramm die gesichtete Literatur und den schematischen Ablauf der Literaturrecherche dar.

5.1.1. Ergebnisse der Auswertungsstrategie der Literaturrecherche

Insgesamt wurden 6.183 Publikationen aus unterschiedlichen Datenbanken identifiziert.

Identifizierung von Studien über Datenbanken

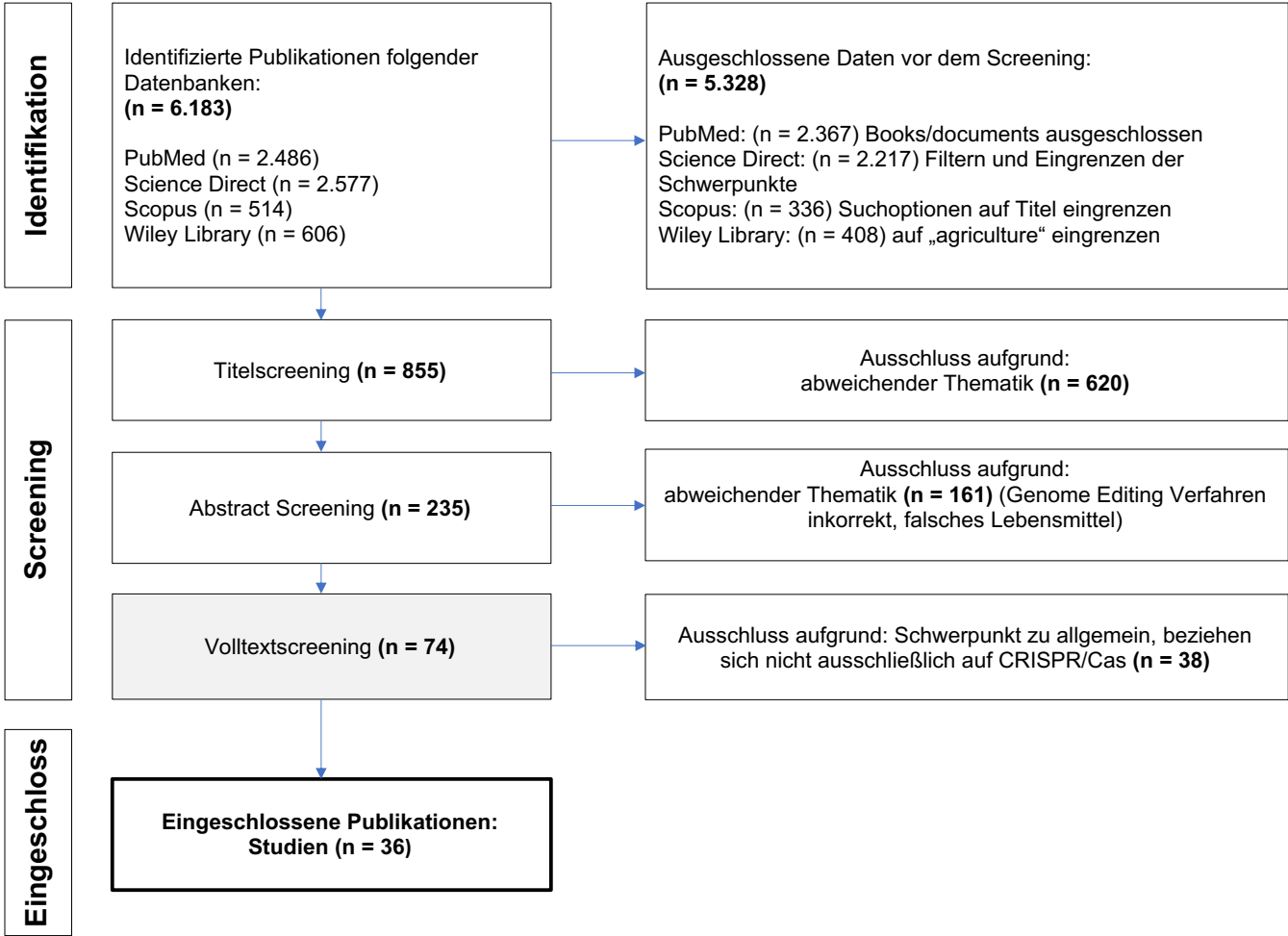


Abbildung 8: Ergebnisse der Auswertungsstrategie modifiziert nach: PRISMA

5.1.2. Anwendungsbeispiel Kartoffel

Im Rahmen dieser Betrachtung wird die wissenschaftliche Datenlage für die möglichen Anwendungen von CRISPR/Cas in Bezug auf Pflanzeigenschaften anhand der im Titel erwähnten Lebensmittel Kartoffel und Tomate differenziert dargestellt. Die besagten Publikationen zielen größtenteils auf marktorientierte Studien ab, die in mittel bis langfristige Zukunft eine Zulassung und Vermarktung anstreben. Es soll sich aus den Erkenntnissen der Grundlagenforschung heraus ein wirtschaftlicher und universell einsetzbarer Nutzen für die Pflanzenzucht und damit für die Landwirtschaft ergeben.

Pflanzeigenschaften der Kartoffel zu verändern, beruht auf der Modifikation von Pflanzengen. Welche dieser Gene in Kartoffeln für zum Beispiel die Reduktion toxischer Inhaltsstoffe, Pathogenresistenz oder verbesserten Qualitätseigenschaften beitragen wird deutlich. Dafür werden nachfolgend die unterschiedlichen Eigenschaften, die mit CRISPR/Cas in der Kartoffelpflanze hervorgerufen, verstärkt oder reduziert werden können, präsentiert. Zu jeder dieser Eigenschaften existieren Studien, deren Fragestellungen, sich explizit auf das Ziel beziehen ein bestimmtes Gen zu exprimieren, das die jeweilige gewünschte Pflanzeigenschaft ausprägen soll. Der allgemeine Anwendungsbereich Pflanzeigenschaften mit CRISPR/Cas zu verändern, werden spezifisch und anhand von der Kartoffel *Solanum tuberosum* und darauffolgend von der Tomate *Solanum lycopersicum* dargestellt.

Verbesserung von Geschmackseigenschaften und Nährstoffgehalt

Für den Nährwert spielen in der Kartoffelzüchtung Polyphenoloxidasen (PPO) eine entscheidende Rolle. Es handelt sich um Enzyme, die dunkle Verfärbungen in Obst und Gemüse verursachen, indem sie phenolische Substanzen in Chinone umwandelt. Diese enzymatische Bräunung kann zudem unerwünschte geschmackliche Beeinträchtigungen erzeugen und zu einer Senkung des Nährwertes führen. Das Kartoffelgenom besitzt eine Genfamilie, die für PPOs kodiert und unterschiedliche Expressionsmuster nachweist. In der Studie von González et al., publiziert im Jahr 2020 wurde das CRISPR/Cas9-System genutzt, um Mutationen im Gen „*Solanum tuberosum* Polyphenol Oxidase 2 (StPPO2) der tetraploiden Kartoffelsorte Desiree zu entwickeln. Der CRISPR/Cas-Komplex wurde direkt als Ribonucleoprotein complex (RNPs) in die Zelle transportiert. Durch die gezielte Bearbeitung des Gens war eine Verringerung der PPO-Aktivität in den Knollen zu erwarten. Fast 70% der entstandenen Kartoffelpflanzen wiesen mindestens eine Mutation in einem Allel des Zielgens auf. Weitere 20% zeigten StPPO2-Mutationen in allen vier Allelen. Die Mutationen in den Allelen des StPPO2-Gens führten zu Kartoffellinien mit einer 69% verringerten

PPO-Aktivität in den Kartoffelknollen. Die verringerte PPO-Aktivität führte somit zu der Reduktion der enzymatischen Bräunung. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe wurde die enzymatische Bräunung um 73% reduziert (González et al., 2020, p. 2-5).

Bei der Veränderung der Pflanzenarchitektur werden Merkmale verändert, die die physische und strukturelle Gestalt der Pflanze betreffen. Dazu gehören zum Beispiel Höhe, Wachstumsform (Blatt und Blüte), Art der Fruchtbildung und Farbe. Die Anwendung von CRISPR/Cas konnte in folgender Studie Teile der Pflanzenarchitektur beeinflussen.

Verbesserte Qualität und Haltbarkeit

Die Kulturkartoffel ist nach der Ernte vielen Belastungen ausgesetzt, wie zum Beispiel der Kälte-induzierten Süßung (Cold-Induced Sweetening, CIS), bei der Saccharose in reduzierende Zucker: Glukose und Fruktose umgewandelt wird (Yasmeen et al., 2022, p.1). Eine Studie aus dem Jahr 2022 stellt die Anwendung der CRISPR/Cas9-Technologie zur Eindämmung einer vermehrten Ausbildung von reduzierenden Zuckern dar. Diese Umwandlung wird während der Lagerung bei kalten Temperaturen begünstigt und ist ein verehrendes Problem für die verarbeitende Industrie. Bei der Chips- und/oder Pommes frites Produktion werden Kartoffeln unter Hochtemperatureinwirkung verarbeitet. CIS-befallene Kartoffeln bilden dabei verstärkt Acrylamid aus, weshalb kartoffelverarbeitende Betriebe, Sorten mit wenig reduzierenden Kartoffeln bevorzugen (Hameed et al., 2020, p. 185-205). Deshalb nahmen die Forscher eine gezielte Veränderung am Gen „Vacuolar Invertase“ (VInv) vor. Das Gen ist für die Produktion der Invertase entscheidend und wichtig für den Zuckerstoffwechsel. Die durch CRISPR/Cas induzierte geringere Gens Expression führte zu einer geringeren VInv-Enzymaktivität. Daraus folgte eine nachweislich verminderte Bildung von Kühl- und Süßungszuckern nach der Ernte. Die Forscher verwendeten zwei sgRNAs, um das VInv-Gen in lokalen Kartoffelsorten herunterzuregulieren. Diese Forschung stellt den ersten erfolgreichen Nachweis eines Knockdowns des VInv-Gens in Kartoffeln dar, was die Kälte- induzierte Süßung reduziert (Yasmeen et al., 2022, p. 2).

Wenig später zeigten auch Ly et al. in den Kartoffelsorten Atlantic und Desiree, dass eine durch CRISPR/Cas9 induzierte Störung der für VInv kodierenden Gene eine reduzierte Akkumulation von reduzierenden Zuckern und eine Abnahme der enzymatischen Bräune nachweist und somit gesündere Kartoffelprodukte erzeugt. Neben VInv wurde zudem das Gen „Asparagin Synthetase 1“ (AS1) durch die Multiplex-CRISPR/Cas9-Anwendung gestört. Das Gen ist angewiesen das Enzym Asparaginsynthetase zu produzieren. Es ist entscheidend für die Synthese von Asparagin, einer Aminosäure, die daran beteiligt ist CIS zu verursachen. Unter Kälteeinwirkung nimmt es zu und bei Raumtemperatur wird es in

reduzierende Zucker umgewandelt. Drei der vier gRNAs zeigten Deletionen, Insertionen und Substitutionen an den Zielgenen. Die editierten Kartoffellinien der Sorte Desiree waren heller gefärbt und wiesen 85% weniger Acrylamid unter Hochtemperatureinwirkung auf (Ly et al., 2023, p.2-16).

Die Überwindung der Selbstinkompatibilität von Kartoffeln ist eine weitere Eigenschaft, die für züchterische und qualitätssteigernde Zwecke nützlich sein kann. Dafür wird das sRNase-Gen, was die Selbstinkompatibilität von Kartoffeln kontrolliert mit CRISPR/Cas deaktiviert. In der Regel sorgt sRNase dafür, dass sich die Pflanze mit ihrem eigenen Pollen nicht selbst bestäubt. Selbstinkompatible diploide Kartoffeln tragen dazu bei Inzuchtlinien zu schaffen und positive Qualitätsmerkmale, wie Textur, Lagerfähigkeit und Kochverhalten beeinflussen zu können (Ye et al., 2018, p. 651-654).

Veränderte Pflanzenarchitektur (optisch)

Die Studie von Ma et al. erschien 2019. Ziel ist es gewesen mit dem CRISPR/Cas9-System bei Kartoffeln Mutationen zu induzieren, indem das Gen „Solanum tuberosum phytoene Desaturase“ (StPDS) ausgeknockt wird. Das Gen produziert Enzyme, die für die Carotinoid-Biosynthese verantwortlich sind. Somit regulieren sie den Pigmentgehalt sowohl in der Pflanze als auch in der Knolle. Die StPDS-Sequenz wird mit Hilfe eines Online Tools analysiert und darauf aufbauen die Zielsequenz von StPDS designt. Der Komplex wurde durch Agrobacterium-vermittelte Transformation in *Solanum tuberosum* eingebracht. Nach der herbeigeführten Mutation bildeten die mutierten Kartoffeln einen deutlichen Albino-Phänotyp (Farbverlust) aus. Dies entstand durch die gehemmte Carotinoidproduktion und der darauffolgenden veränderten Pigmentierung. Ein geringerer Carotinoidgehalt in Kartoffeln ist für bestimmte Verarbeitungs- und Vermarktungsanforderungen von Lebensmitteln gewünscht, bei denen eine spezielle Farbe oder ein bestimmtes Aussehen bevorzugt wird (Ma et al., 2019, p.482-485).

Reduktion toxischer Inhaltsstoffe

Die Verwendung von CRISPR/Cas um toxische Steroidglykoalkaloiden (Steroidal glycoalkaloids, SGAs) in Kartoffelsorten zu reduzieren bringt einen erheblichen Mehrwert für die Verträglichkeit, Qualität und Sicherheit der Kartoffel für den menschlichen Verzehr mit sich. Die Studienergebnisse belegen, dass in tetraploiden Kulturkartoffeln eine spezifische Sequenz des Gens „Sterol side chain reductase 2“ verändert werden kann. Bei (StSSR2) handelt es sich um ein Schlüsselenzym bei der Synthese von SGAs. Die Konstruktion des CRISPR/Cas Vektors wurde mit Agrobacterium-vermittelter Transformation in *S. tuberosum* transportiert. Die Studie zeigt, dass im Vergleich zum Wildtyp 66% der toxischen SGA-Konzentration im Knollenfleisch reduziert werden konnte (Z. Zheng et al., 2021, p. 482-490).

Das molekulare Einbringen des CRISPR/Cas-Komplexes in pflanzliche Protoplasten trägt ebenso zur Qualitätsverbesserung bei. In folgender Studie wurde die Genombearbeitung in Kartoffel-Protoplasten vorgenommen mit dem Ziel das toxische Glycoalkaloid α -Solanin zu minimieren, das sich durch einen grünlichen Phänotyp der Kartoffel äußert. Statt dem Vehicel der Acrobacterium-vermittelten-Transformation wurde für das Einbringen des CRISPR/Cas-Komplexes in die Zelle die Methode der gold nanoparticle mediated (GE-NOME)-Lasertransfektion gewählt. Der Laser erlaubt eine kurzfristige Permeabilisierung der Zellmembran in der das CRISPR/Cas System in die Pflanzenzelle gelangt und die Mutation auslöst. In diesem Fall wurde das Gen „Steroid Glycoalkaloid Biosynthetic 1“ (SGT1) verändert. Das Gen ist an der Produktion von α -Solanin beteiligt und nimmt eine Funktion in der Bildung dieser toxischen Verbindung in Kartoffeln ein. Durch die hervorgerufene Mutation am SGT1-Gen, kann das Potenzial, die Qualität durch das Eindämmen der Solaninproduktion zu steigern, weiter ausgeschöpft werden (Londenberg et al., 2020, p. 2-6). Eine weitere Studie aus dem Jahr 2018 zeigt, dass ein Knockout des Gens „Stearoyl-ACP Desaturase“ (St16DOX) durch eine induzierte und zielgenaue Mutation mit CRISPR/Cas zu einer Erzeugung von α -Solanin-freien Kartoffelhaarwurzeln bei tetraploiden Kartoffeln beiträgt. Auf der Grundlage von In-silico-Analysen, die computergestützte Analysen darstellen, um geeignete gRNAs zu identifizieren, die zu der gewünschten Zielregion passen, werden drei synthetischen gRNA-Moleküle für St16DOX hergestellt, die gemeinsam mit dem CRISPR/Cas-Komplex durch Elektroporation in den Organismus eingebracht werden. St16DOX bezieht eine zentrale Rolle bei der Ausbildung von SGAs in Kartoffelhaarwurzeln, weshalb durch die Ausschaltung des Gens die α -Solanin-Akkumulation lokal vollständig aufgehoben werden kann (Nakayasu et al., 2018, p. 70-77).

Verbesserte Pathogenresistenz

Zur Verbesserung der Resistenz von Pflanzen werden vorzugsweise Mutationen an Anfälligkeitgenen erzeugt. Das liegt an der gewünschten Effektivität und Nachhaltigkeit der erzielten Resistenz. In Pflanzen begünstigen Empfindlichkeitsgenen die Vermehrung von Krankheitserregern. Sie werden von Schadorganismen ausgenutzt, um in die Pflanze zu gelangen. Eine dauerhafte Resistenz könnte durch entsprechendes Deaktivieren solcher Genen mit CRISPR/Cas gewährleistet werden (R. Li et al., 2022, p. 5-9). Herkömmliche Resistenzgene vermögen über eine wesentlich begrenztere Wirksamkeit, die durch mutierte Erreger schneller überwunden werden kann. *Phytophthora infestans* (*P. infestans*) ist eine verheerende Krankheit, die die Pflanzenproduktivität ernsthaft gefährdet. *P. infestans* ist der Erreger der Spätfäule/Kraut- und Knollenfäule.

Folgende Studie widmet sich sieben potenziellen Sensitivitätsgenen. Davon konnten spezifische Deletionen der Sensitivitätsgene „Solanum tuberosum Disease Resistance Protein DND1“ (StDnD1), „Solanum tuberosum Chlorophyllase 1“ (StCHL1) und „Solanum tuberosum Downy Mildew Resistance 6-1“ (StDMR6-1) durch ein CRISPR/Cas9-System erzeugt werden, wodurch eine erhöhte Resistenz gegenüber *P. infestans* sichergestellt werden konnte. In Pflanzen in denen StDnD1 mutierte wurde zugleich eine pleiotrope Wirkung registriert. Neben der *P. infestans* Resistenz ergab sich gleichzeitig ein Wachstumsphänotyp. Die spezifischen Vektorkonstrukte der zwei verwendeten gRNAs, wurden basierend auf den Online-Tools Cas-designer und CRISPOR identifiziert, die gRNAs anschließend synthetisiert und mittels Agrobacterium-vermittelter Transformation in Form des CRISPR/Cas-Komplexes die Kartoffelzelle injiziert. (Kieu et al., 2021, p.3-4).

Das Kartoffelgen „Solanum tuberosum Ethylene Response Factor 3“ (StERF3) in Kartoffeln ist ebenfalls ein Sensitivitätsgen, was nach der Infektion mit Krankheitserregern erhöht ist. In der Studie von (Razzaq et al., 2022, p.3-9) konnte durch gezieltes Editieren von StERF3 in der Kartoffelsorte „Lady Rosetta“ mit CRISPR/Cas9 die Empfindlichkeit der Pflanze gegenüber bestimmten Pathogenen, wie *P. infestans* reduziert werden indem das editierte Gen funktional gehemmt wurde. Die daraus entstehenden Knockoutlinien führten zu einer effektiveren Immunantwort der Kartoffel und zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Krankheitserreger. Die für die Anwendung des CRISPR/Cas-Systems erforderliche Zielsequenz wurde dem National Center for Biotechnology Information (NCBI) entnommen.

Die eIF4E-Genfamilie ist bei vielen Pflanzenarten hauptauschlaggebend, um mit CRISPR/Cas rezessive Resistenzen gegen das *Potato virus Y* (PVY) hervorzurufen. Das PVY virus wird von mehr als 50 unterschiedlichen Blattläusearten übertragen. *Myzus persicae* ist der populärste Überträger (Quenouille et al., 2013, p. 439-452). Das Virus ist kennzeichnend für Blattverfärbungen, Nekrosen und deformiertes Wachstum. Folgen sind Ernte- und Qualitätsverlust. Die tetraploide Kartoffelsorte Desiree wurde verwendet, um die Möglichkeit einer Erweiterung des PVY-Resistenzspektrums durch CRISPR/Cas9 zu untersuchen, indem das Empfindlichkeitsgen „Eukaryotic translation initiation factor E1“ (eIF4E1) ausgeschaltet wird. Die Ergebnis-Daten zeigen, dass PVY-resistente Pflanzen produziert werden können und die eIF4E1-Editierung sinnvoll genutzt werden kann, um das PVY-Resistenzspektrum von Kartoffelsorten zu erweitern (Lucioli et al., 2022, p. 1, 4). Eine weitere Studie untersuchte dasselbe Empfindlichkeitsgen an der Kartoffelsorte Kruda. Auch hier zeigten die mutierten Linien eine erhöhte Resistenz gegenüber PVY (Noureen et al., 2022, p. 1-4). Weiter zeigten Forscher der Studie von Makhotenko et al. von 2019, dass die Bearbeitung des Coilin-Gens mit CRISPR/Cas zu einer signifikanten Steigerung der PVY-

Resistenz führt und gleichzeitig eine erhöhte Toleranz gegenüber Salz- und osmotischem Stress bot (siehe auch Unterkapitel: Abiotische Faktoren). Das Protein Coilin spielt eine Rolle bei der Interaktion zwischen PVY und der Kartoffel-Wirtspflanze. Es wird vermutet, dass es die virale Ausbreitung begünstigt, weshalb ein Knockout des Gens die Virusresistenz steigert (Makhotenko et al., 2019, p.88-91).

Verbesserte Stärkezusammensetzung und -produktion

Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) zählen neben Reis und Weizen zu den wichtigsten Nahrungspflanzen. Die Knollen der Kartoffeln sind eine bedeutende Quelle für diätetische Kohlenhydrate in Form von Stärke, die in verschiedenen industriellen Anwendungen verwendet wird.

Stärke besteht aus den Polysacchariden Amylose und Amylopektin, deren Verhältnis normalerweise bei 1:4 liegt und bei Bearbeitung dieser Mengenverhältnisse verschiedene Eigenschaften und Funktionen bestimmt werden können. Sorten mit einem höheren Gehalt an Amylopektin sind in der Lebensmittelverarbeitung und Industrie vielseitig einsetzbar. Ein amylosefreier Phänotyp der Kartoffelstärke mit spezifischen Eigenschaften ist zum Beispiel für die Herstellung von Lebensmittelzusatzstoffen relevant. In einer Studie wurde mit Hilfe von CRISPR/Cas das Kartoffelgen „Granule-Bound-Starch Synthase“ (GBSSL) der Kartoffelsorte Yukon Gold ausgeknockt, um die Amylose-Komponente der Stärke zu eliminieren. Bei der Methode, um den CRISPR/Cas-Komplex in die Kartoffelzelle zu liefern, handelte es sich auch hier um die Agrobacterium vermittelte Transformation. Somit konnte das Viskositätsprofil der Knollenstärke beeinflusst werden (Toinga-Villafuerte et al., 2022 p.1-13). Eine weitere Studie belegt die Manipulation der Stärkequalität durch das Ausschalten des Gens „Granule-Bound Starch Synthase 1“ (GBSS1) mit CRISPR/Cas, was die Funktion der Amylosesynthese übernimmt. Die daraus entstehenden Mutanten konnten gewünschte Stärkeeigenschaften, wie eine wachsartige Kartoffelknolle erzeugen (Tuncel & Qi, 2022, p 2-9). Die Studie von Abeuova et al. aus dem Jahre 2023 führte ebenfalls Forschungen zu GBSS1 durch. Es wurden drei spezifische Regionen im GBSS1-Gen ausgewählt, um das Gen durch die mutationsauslösende Technologie des CRISPR/Cas-Systems funktionsunfähig zu machen und einen vollständigen Knockout des Gens zu erzielen. Dies führte zur eindeutigen Produktionsverlust von Amylose (Abeuova et al., 2023, p.2-4). Die Bestandteile der Kartoffelstärke sind in Granulaten unterschiedlicher Größe gelagert. Die Größe der Granulate hängt von der Teilung der Plastiden (Organellen der Pflanzenzelle) ab, die wiederum von Proteinen gesteuert werden und unter anderem für die Stärkespeicherung zuständig sind. Das Gen „Filamentous Temperature-sensitive Z1“ (FtsZ1) gehört zu den tubulinähnlichen GTPasen, die eine Rolle bei der Zellteilung spielen und somit gleichzeitig funktionell bei der Plastidenteilung mitwirken. Durch das Bewirken einer verminderten

Expression durch Genom Editierung mit CRISPR/Cas entstehen in den Pflanzenzellen in der Kartoffelpflanze Makroplastide. Durch das Editieren von FtsZ1 wird somit Einfluss auf die Größe der Stärkegranulate in den Knollen genommen. Die entwickelten Kartoffellinien wiesen knapp die doppelte Größe an Stärkegranulat im Vergleich zum Wildtyp auf. Eine der Linien zeigte zusätzlich eine verdoppelte Endviskosität. Die Studie zeigte, dass mit gezieltem Editieren und der damit verbundenen Stärkegranulatveränderung unter anderem die Textureigenschaften von *Solanum tuberosum* auf unterschiedliche industrielle Anwendungen zugeschnitten werden kann (Pfothner et al., 2023, p. 2-11).

5.1.3. Anwendungsbeispiel Tomate

Nachstehend werden Eigenschaften, die für die Tomatenzüchtung von Bedeutung sind vorgestellt. Es werden Sorten entwickelt, die den Anforderungen der Landwirtschaft entsprechen und die Bedürfnisse von Produzenten und Verbrauchern berücksichtigen, um dem Markt gerecht zu werden. Hierbei spielen unterschiedliche (Tomaten-) Gene eine Rolle, deren Funktion bekannt sein müssen, um eine Mutation mit Hilfe von CRISPR/Cas innerhalb eines solchen Gens hervorzurufen zu können.

Verbesserung von Geschmackseigenschaften und Nährstoffgehalt

Die Studie von Wang et al. von 2021 zeigt, dass die Forscher CRISPR/Cas9 zur gezielten Bearbeitung der Gene „*Solanum lycopersicum* invertase inhibitor 1“ (SIINVINH1) und „*Solanum lycopersicum* Vacuolar Processing Enzym 5“ (PeSIVPE5) in Tomatenfrüchten verwendet haben, um den löslichen Zuckergehalt in den Früchten zu erhöhen. Zellwandinvertasen fördern die Entladung von Saccharose in den Früchten und hemmen somit die Anhäufung von löslichem Zucker in Tomatenfrüchten, weshalb sie durch die CRISPR/Cas-Technologie ausgeschaltet wurden. Dies führte zu einer erhöhten Invertase-Aktivität und einer verbesserten Zellstruktur, was zu einem höheren löslichen Zuckergehalt in den Tomatenfrüchten und zu einem verbesserten Geschmack sowie süßeren Früchten führt. Beide Gene wirken synergistisch (B. Wang et al., 2021, p. 544-555). In einer ähnlichen Studie wurden genetisch veränderte Linien der Tomatensorte „Suzukoma“ erzeugt, indem ebenfalls das SIINVINH1-Gen durch CRISPR/Cas9 ausgeschaltet wurde. Drei ausgewählte Linien besaßen fast dasselbe Fruchtgewicht, wie die Ursprungssorte, wiesen dafür allerdings einen 29% höheren Fruktose- und einen 36% höheren Glukosegehalt als die ursprüngliche Sorte auf (Kawaguchi et al., 2021, p. 1-9).

Carotinoide sind natürliche Pigmente, die für die rote, orange oder gelbe Farbe in vielen Obst- und Gemüsesorten verantwortlich sind. In Tomaten sind Carotinoide wie Lycopin,

Beta-Carotin und Lutein enthalten. Ein höherer Gehalt an Carotinoiden in Tomaten kann zu einer intensiveren roten oder orangen Farbe führen. Diese Farbstoffe sind auch Antioxidantien und können zur gesundheitlichen Wirkung der Tomaten beitragen.

Der Geschmack einer Tomate wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, einschließlich der Menge und des Gleichgewichts von Aromaverbindungen, Zuckergehalt und Säuregehalt. Ein höherer Gehalt an Carotinoiden, insbesondere Lycopin, kann den Geschmack einer Tomate verbessern, indem er zu einem süßeren und fruchtigeren Aroma beiträgt. Darüber hinaus können Carotinoide auch Bitterstoffe reduzieren, was ebenfalls zu einer angenehmeren Geschmacksnote beitragen kann (Kim et al., 2023, p. 2-11). Carotinoide verleihen eine attraktive Fruchtfarbe und tragen zur wirtschaftlichen Qualität bei. Lycopinanreicherung ist von Vorteil, um funktionelle Eigenschaften in Tomaten zu verbessern. Die nächste Studie konzentriert sich auf die Akkumulation des Lycopingehaltes in Tomatenfrüchten.

Die Strategie von (X. Li et al., 2018, p. 1-10), war es die Biosynthese von Lycopin zu fördern und die Umwandlung von Lycopin in β und α -Carotin zu hemmen. Indem einige Gene, die mit dem Carotinoid-Stoffwechsel assoziiert sind, abgebaut wurden, konnte Lycopin vermehrt angereichert werden. Die Aktivität von Schlüsselgenen im Lycopinstoffwechsel unterschiedlich zu beeinflussen, zeigte sich als wirksam für die Steigerung des Lycopingehalts. 5 ausgewählte Gene, die durch das CRISPR/Cas-System mittels *Agrobacterium tumefaciens* vermittelter Transformation im Tomatengenom punktspezifisch verändert wurden, verhalfen zum 5,1-fachen Lycopingehalt, was zu sichtbaren Farbmerkmalen der mutierten Früchte nach dem Reifestadium führte. Es handelte sich um die Zielgene „Stay-green 1“ (SGR1), „Lycopene epsilon-cyclase“ (LCY-E), „Beta-Carotene hydroxylase“ (Bhc) sowie „Lycopin beta cyclase 1 und 2“ (LCY-B1 und LCY-B2). SGR1 ist für den natürlichen Chlorophyllabbau verantwortlich und LCYE sowie LCYB wandeln Lycopin in β -Carotin und Carotin um. Der Lycopingehalt des veränderten SG1 Gens war am höchsten. Die Früchte zeigten dementsprechend die ausgeprägtesten Farben. Diese Multiplexlösung hebt sich von weiteren Studien ab, da sich die meisten Forschungen ausschließlich auf die Modifikation eines einzelnen Gens konzentrieren (X. Li et al., 2018, p. 415-421). Kim et al. beschreibt einen Ansatz, um das Gen „Stay-green 1 Protein“ (SGR1) mit CRISPR/Cas zu inaktivieren und somit SGR1-Knockout-Linien zu produzieren. Die Nachweisverfahrenen (RNA-Sequenzierung und GC-Massenspektrometrie) belegten, dass die Knockout-Linien reicher an Chlorophyll und Carotinoiden waren als die im Vergleich stehende Wildtyp-Frucht. SGR1 beeinflusst ebenfalls die Seneszenz, der Blattalterung. Ist das SGR1 inaktiv, bleibt Chlorophyll länger in den Blättern- und Früchten enthalten. Die Chloroplasten haben

eine verlängerte Lebensdauer und mehr Nähr- und Farbstoffe (Carotinoide, wie Lycopin) können in den Früchten angesammelt werden (Kim et al., 2023, p. 2-11).

In folgender Studie wurden aus den Tomatensorten „MoneyMaker“ und „San Marzano“ genomeditierte und transgenfreie Tomatenlinien entwickelt, indem eine Insertion und eine Deletion mit Hilfe von CRISPR/Cas9 in den Greenflesh/Staygreen-Locus (reguliert Chlorophyll-Abbau) eingebracht wurde. Die Genbearbeitung gilt als effizient und robust. Es wurden keine Gen-Editing-Aktivitäten an erwarteten Off-Target-Standorten nachgewiesen. Die Tomaten sollen als Beispiele für Sorten für den Frischverzehr und die industrielle Verarbeitung stehen. Das Enzym Mg-Dechelatase, was für den Chlorophyllabbau verantwortlich ist konnte durch den Knockout nicht mehr hergestellt werden. Während der Fruchtreifung führte das zu einem deutlichen Anstieg an Carotinoiden und Tocopherolen. Beide Greenflesh-Linien zeigten eine reduzierte Chlorophyllabbaufähigkeit, weshalb Carotinoid- und Tocopherolspiegel potenziert werden konnten. Die Ergebnisse bieten attraktive Vorteile in der Züchtung und haben für den Verbraucher einen gesundheitlichen Nutzen (Gianoglio et al., 2022, p. 1-9).

Die Studie von Nguyen et al. stellt Erkenntnisse zu gezielten Mutationen des Gens „Solanum lycopersicum basic Zipper 1“ (SIZIP1) vor, das unter Einfluss des CRISPR/Cas9-Systems höhere Zucker- und Aminosäuregehalte in den Tomatenfrüchten hervorbringt. In der Regel nimmt das SIZIP1-Gen Einfluss auf die Proteinbiosynthese. Bei diesem Mechanismus entscheidet die Anwesenheit von Saccharose in der Zelle über das Ausmaß der Herstellung von Proteinen. Je höher der Saccharosegehalt in der Tomatenzelle ausfällt, umso stärker wird die Proteintranslation gehemmt. Durch verschiedene nachgewiesene SIZIP1-Mutationen, die Einfluss auf die Zucker- und Aminosäurebiosynthese nehmen, konnten in neu editierten Tomatenpflanzen höhere Gehalte an löslichen Feststoffen, Zucker sowie gesteigerte Gesamtaminosäuregehalte in Tomatenfrüchten nachgewiesen werden, was zu einer vorteilhafteren Nährstoffzusammensetzung führt. Aminosäuren, wie Asparaginsäure und Glutaminsäure, die für sauer schmeckende Eigenschaften bekannt sind, steigerten sich um 77 bis 144%. Alanin, Glycin, Prolin, Serin und Threonin, die süß schmeckenden Geschmackskomponenten ausmachen erhöhten sich zwischen 14% bis 107% (Nguyen et al., 2023, p.3-5).

GABA ist ein funktioneller Inhaltsstoff in Lebensmitteln, der den Blutdruck senken- und eine entspannte Wirkung auf den menschlichen Organismus ausüben soll (Ezura, 2022, p.2).

Eine Studie von Rui Li et al. aus dem Jahr 2018 beeinflusste den γ -Aminobuttersäure (GABA)-Stoffwechselweg in Tomaten. Mit einem Multiplex pYL-CRISPR/Cas9-System, was

ein speziell für die Pflanzenforschung entwickeltes CRISPR/Cas-System darstellt entstanden insgesamt 53 genomeditierte Tomatenpflanzen, von denen jede einzelne bis vierfache Mutationen aufwies. Die zuvor ausgewählten Zielgene waren GABA-transaminase subunit precursor isoforme 1-3 (TP1-3), Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (SSADH) und das Enzym cationic amino acid transporter 9 (CAT9), die mit der Regulation des GABA Gehalts assoziiert werden. Für den molekularen Mechanismus einer hochkonzentrierten GABA-Akkumulation soll auch das Gen „Solanum lycopersicum γ -Aminobutyric Acid Translocator D3 (SIGAD3) beitragen. Eine 19-mal, signifikant höhere GABA Anreicherung wurde im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen in Tomatenblättern- und Früchten nachgewiesen. Zudem wurde mit einer oder zwei gRNAs das Gen „tomato phytoene desaturase“ (PDS) angezielt und mehr als 61% der gewünschten Zielorte editiert, sodass durch ursprüngliche Funktion des PDS-Gens im Carotinoidbiosyntheseweg, die Veränderung der Fruchtfarbe bewirkt werden konnte (R. Li, Li, et al., 2018, p.415-421).

Die Zielsetzung der Studie von Zhi et al. aus dem Jahre 2020 galt der Ermittlung, der exakten Funktion des Gens „Solanum lycopersicum Anthocyaninless 2“ (SIAN2) in Tomaten. Es sollte festgestellt werden, ob es an der Regulation der Anthocyanin-Akkumulation im vegetativen Tomatengewebe beteiligt ist und ob es möglicherweise Auswirkungen auf die Fruchtfarbe hat. Durch CRISPR/Cas wurden Mutanten der Sorte „Indigo Rose“ hergestellt, indem in SIAN2 gezielt eine Mutation eingeführt wurde. Der Knockout von SIAN2 in den mutagenisierten Pflanzen verringerte jedoch signifikant den Anthocyanin Gehalt im Vergleich zum intakten Gen der „Indigo Rose“ Sorte. Durch den Vergleich der Mutanten mit dem intakten Gen wurde deutlich, dass SIAN2 entscheidend und verantwortlich für die Anthocyaninproduktion in der violetten Tomatensorte ist und sie spezifisch reguliert (Zhi et al., 2020, p.799-806). Anthocyane gehören zu der Gruppe der Flavonoide (sekundäre Pflanzenstoffe). Es handelt sich um Pflanzenpigmente, die für unterschiedliche Farbgebungen vieler Früchte, Gemüse und Blüten beitragen und sowohl eine antioxidative Wirkung haben sollen als auch bei der Neutralisierung von oxidativem Stress förderlich sein könnten (Motohashi, 2008, p.5).

Verbesserung der (Frucht)-qualität und Haltbarkeit

Eine angemessene Qualität der Tomatenfrüchte hat besonders für den Handel und ebenso für den Verbraucher einen hohen Stellenwert. Hierbei spielen Attribute, wie Textur, Größe, Festigkeit und Haltbarkeit eine entscheidende Rolle. Nachstehende Publikationen zeigen, wie die CRISPR/Cas-Technologie dazu beiträgt Qualitätseigenschaften der Tomate effektiv zu gewährleisten.

In der Studie von Wang et al. im Jahr 2019 wurde das Qualitätsmerkmal der Haltbarkeit von Tomatenfrüchten thematisiert. Es wurden CRISPR-Mutanten von reifungsbezogenen Genen in Tomaten untersucht, die für Pektin abbauende Enzyme, wie Pectate Lyase (PL), Polygalacturonase 2a (PG2a) und b-Galactanase (TBG4) kodieren. Pektin stellt eine ausschlaggebende Komponente in der Tomatenzellwand dar. Je mehr Pektin abgebaut wird, desto weniger fest und haltbar sind die Früchte, weshalb die Funktion der erzeugten Gen-Mutanten, darin bestand Pektin abbauenden Enzyme zu produzieren, die den Pektin Abbau verlangsamen. Einzig die PL-Mutation führte zu festeren Früchten während der Reifung. Mutationen in (PG2a) sowie in (TBG4) beeinflussten ausschließlich Farbe und Gewicht (siehe auch nachstehendes Unterkapitel: Pflanzenarchitektur). Die Studienergebnisse verdeutlichen die Rolle der untersuchten Gene bei der Modulation des Pektin Abbaus und der Zellwandstruktur in reifen Tomatenfrüchte (Wang et al., 2019, p. 570-577).

Veränderung der Pflanzenarchitektur

Die Pflanzenarchitektur sowie die Wachstumsgewohnheiten von Tomatenpflanzen haben einen Einfluss auf den Anbau und die Pflege der Pflanzen. Einige Wachstumsgewohnheiten begünstigen die Effizienz der Ernte und können die Platznutzung optimieren. Zudem werden Tomaten je nach Verwendungszweck in unterschiedlicher Form und Größe bevorzugt. Ründere Formen kommen tendenziell auf Frischemärkten für den Direktverzehr zum Einsatz wohingegen plum-förmige Tomaten für Saucen und Verarbeitungsprodukte adäquater sind. Anknüpfend dazu sind nachfolgend die Ergebnisse aus Literaturrecherche für die Erarbeitung von veränderter Pflanzenarchitektur in Tomaten mit CRISPR/Cas dargestellt.

In folgender Studie wurde das Gen „Solanum lycopersicum MYB transcription factor 3 repressor 3“ (SIMYB3R3) in Tomaten untersucht, welches bevorzugt in Blüten exprimiert wird und einer Unterklasse von Zellzyklus-Genen in der Modellpflanze *Arabidopsis* ähnelt (MYB3R3/5). Unter Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems wurden SIMYB3R3-Knock-out-Mutanten erzeugt. Die morphologische Untersuchung der Mutanten ergab, dass längliche bis erdnussförmige Früchte wachsen, was auf eine erhöhte Anzahl an Zellen in Längsrichtung schließt. Für gewöhnlich unterdrückt SIMYB3R3 Gene, die den Zellzyklus regulieren, weshalb die Deletion von SIMYB3R3 zu Fruchtformen führt, die veränderten Zellteilungsmustern in der Entwicklung des Fruchtkörpers unterliege. SIMYB3R3 und ähnliche Gene haben somit das Potenzial in der zukünftigen Züchtung von Obstsorten gewünschte Fruchtformen zu erzeugen (Q. Zheng et al., 2022, p.7313-7321).

Neben der Veränderung der Tomatenform spielt die Fruchtfarbe einen ausschlaggebenden Faktor für den Tomatenabsatz. Die Fruchtfarbe wurde bereits unter der veränderten Eigenschaft: „Geschmack und Nährstoffgehalt“ angesprochen. In folgender Studie liegt der Fokus

des Forschungsziels auf der optischen Pflanzenstruktur, weshalb die Studie unter der Kategorie „Pflanzenarchitektur“ eingeordnet ist. Es wurden genomeditierte Tomatenlinien gewonnen, indem Tomaten der Sorte „Ailsa Craig“ an drei unterschiedlichen Genen editiert wurden. Mit einem CRISPR/Cas-Multiplex-System wurden das Gen „Phytoene Synthase 1“ (PSY1), das Gen „Myeloblastosis 12“ (MYB12) und das „Stay-green 1“ (SGR1) gleichzeitig adressiert. In weniger als einem Jahr konnten transgenfreie Tomatenfrüchte in den Farben gelb, braun, rosa, hellgelb, rosa-braun-gelb-grün und hellgrün entwickelt werden (T. Yang et al., 2023, p.2-6).

Männliche Sterilität bei Tomatenpflanzen ist ein effektiver Weg, um Produktionskosten für Tomatensamen in der Hybridsaatgutproduktion zu reduzieren und die Reinheit der Sorte zu gewährleisten, indem die Pollenproduktion eingedämmt wird, um weibliche Blüten nicht bestäuben zu können. CRISPR/Cas erlaubt Züchtern männlich sterile Tomatenlinien zu entwickeln, die gleichzeitig die Produktivität einer Hybridsorte nicht beeinträchtigt. In der Studie (Secgin et al., 2022, p.2-5) wurden Gene der Tomate aus der Gen-Familie „Solanum lycopersicum Acotinase“ (SIACO) auf ihre funktionelle Rolle in der Tomate mit CRISPR/Cas vermittelter Genstörung charakterisiert. Das SIACO2-Gen wurde durch sein hohes Expressionsprofil in unterschiedliche genomeditierte Tomatenlinien mutiert. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass die Lebensfähigkeit von Pollen im Vergleich zum Wildtyp geringer ausfielen und die Samen pro Frucht um das Fünffache abnahmen. Gleichzeitig wiesen mutierte Tomatenlinien unter Stressbedingungen (abioitsche Belastung) eine erhöhte Toleranz auf. Weitere Ergebnisse von (Gökdemir et al., 2022, p.329-332) deuten darauf hin, dass durch CRISPR/Cas, das ausgeknockte „Solanum lycopersicum plant homeodomain protei MS1“ (SIPHD_MS1), was normalerweise für die Entwicklung der pollenproduzierenden Organe verantwortlich ist, eine Rolle bei der Entwicklung von männlicher Sterilität spielt. Das zeigten mehrere sowohl homozygote, heterozygote und biallelische Mutationen in Tomatenpflanzen. Weitere Studienergebnissen von Liu et al. aus dem Jahre 2021 zeigten durch das gleichzeitige Ausschalten (KO-Knockout) des Gens „male sterile 1035“ (Ms1035) und von Glutathione S-Transferase (GSTAA), dass CRISPR/Cas effektiv für die Hybrid-Saatgutproduktion in Tomaten angewendet werden kann. Zwei männlich sterile Tomatenlinien wurden generiert. Die Eigenschaft der männlichen Sterilität konnte schnell herbeigeführt werden und als Grundlage und Beispiel für die sterile Elternerzeugung von anderen Pflanzenarten dienen, die ebenfalls für die Hybridproduktion verwendet werden. (J. Liu et al., 2021, p. 2-4). Ein alternativer Ansatz zur Generierung männlicher Sterilität und der Abwesenheit einer kompletten Pollenproduktion in Tomatenpflanzen bietet die Studien von Jung et al. aus dem Jahre 2020. Es wurden Sterilitätsphänotypen durch den Knockout des Gens Solanum lycopersicum (SIMS10) durch CRISPR/Cas herbeigeführt. Insgesamt ergaben sich 11

Mutationstypen innerhalb des Zielgens. Die mutierten Linien zeigten eine disfunktionale Meiose und ein unnatürliches Tapetum (Blütenpollenbehälter), wodurch keine Pollenproduktion möglich gewesen ist. Diese entstandenen Mutationen sind auf weitere Generationen übertragbar (Jung et al., 2020, p. 2-7).

Effektivere Fruchtreife

Ein wesentliches Ziel der kommerziellen Tomatenzucht ist es möglichst hohe Erträge zu generieren. Das führt über den Weg einer effektiven Fruchtreife. Besonders beliebte Sorten stellen Pflanzen mit einer hohen Fruchtzahl und -größe pro Tomatenpflanze dar. Ein optimierter Ertrag trägt zu einer effizienten Nutzung von Land, Wasser und Düngemittel bei. Folgende Publikationen stellen die aktuellen Ergebnisse zu optimierten Frucht-Eigenschaften durch das CRISPR/Cas System dar.

Die Mitglieder der Genfamilie „Cytochrom-(CY)-P78A“ (CYP78A) bestehen aus Tomatengen, die an unterschiedlichen Entwicklungsprozessen beteiligt sind. Darunter zählt die Regulierung des Fruchtgrößenwachstums. Sie sind bei der Modulation des Zellwachstums und der Hormonregulation während der Fruchtentwicklung bei Tomaten relevant. In der Studie von Q. Li et al. von 2022 wurde CRISPR/Cas verwendet, um die Ertragssteigerung in wachsenden Tomatenpopulationen zu beschleunigen, indem eine größere Allelvariation geschaffen wird. Dazu wurden spezifische Veränderungen im *Solanum lycopersicum* KLU Homolog-Promotor (SIKLUH) vorgenommen, der einen Bereich in der DNA darstellt, der die Aktivität eines CYP78A-Gens reguliert. Die Veränderungen im SIKLUH-Promotor wurden um einen einzelnen DNA-Baustein herum vorgenommen, der als M9 Single-Nukleotid-Polymorphismus (M9 SNP) bezeichnet wird und eng mit dem Gewicht der Früchte verbunden ist. Durch die Genom Editierung wollten die Forschenden herausfinden, wie sich die genetischen Veränderungen auf das Fruchtgewicht der Tomaten auswirken. Von 21 hervorgerufenen Allel-Mutationen zeigten fünf Allele eine Zunahme des Fruchtgewichts und eine signifikante Abnahme des Anteils an Kleinfrüchten. Die Studie hebt das Potenzial der Anwendung von CRISPR/Cas bei der CYP78A-Genfamilie für die Ertragsverbesserung von Tomaten hervor (Q. Li et al., 2022, p. 3-7).

In einer Studie aus dem Jahre 2020 von Shu et al. wurde der Stellenwert des Gens „*Solanum lycopersicum* MYC2“ (SIMYC2) bei der Wachstumsregulation in Tomaten charakterisiert. Durch die Verwendung von CRISPR/Cas9 wurde eine SIMYC2-Mutante hergestellt, indem das Gen ausgeknockt wurde, um die Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum zu identifizieren. Die SIMYC2-Mutanten wiesen im Vergleich zu den Wildpflanzen eine erhöhte Anzahl von Blüten und eine geringere Fruchtansatzrate auf. Die Form der Früchte bei den Mutanten war prolat (hohe/s Fruchtqualität/-gewicht), während die Kontrollfrüchte oblat

(geringe Fruchtfleischmenge, ungleichmäßige Reifung) waren. SIMYC2 belegt eine positive regulatorische Rolle hinsichtlich Pflanzenwachstum (Shu et al., 2020, p. 5529ff).

Die genetische Vielfalt hat aufgrund jahrhundertelanger Züchtung von landwirtschaftlichen Nutzpflanzen in Bezug auf Produktivität und Ertrag kontinuierlich abgenommen, sodass nützliche Eigenschaften aus wildlebenden Arten immer weniger zugänglich sind. Die Studienergebnisse von Zsögön et al. stellen eine Methode zur Genom-Editierung mit CRISPR/Cas9 vor, um hilfreiche Eigenschaften wilder Tomatenlinien mit gewünschten agronomischen Merkmalen zu kombinieren. Durch die Adressierung sechs bestimmter Loci, die für Ertrag und Produktivität in heutigen Tomatensorten relevant sind, konnte die wilde *Solanum pimpinellifolium* (*S. pimpinellifolium*) ergebnisreich mit der CRISPR/Cas-Technologie domestiziert werden. Die Morphologie von *S. pimpinellifolium* und die Größe, Anzahl sowie der Nährstoffgehalt der Früchte wurden optimiert. Die bearbeiteten Tomatenlinien dokumentierten eine dreifache Steigerung der Fruchtgröße sowie die zehnfache Steigerung der Fruchtanzahl gegenüber dem wilden Tomatentyp. Die Anreicherung des Fruchtylucopins fiel am bemerkenswertesten aus. Im Vergleich zu *S. lycopersicum* verbesserte es sich um 500%. Diese Erkenntnisse bieten neue Perspektiven für die molekulare Züchtung, bei der die genetische Vielfalt wilder Pflanzen effektiv nutzbar gemacht werden kann (Zsögön et al., 2018, p.1211-1215).

Verbesserung der Pathogenresistenz

Tomatenpflanzen sind besonders anfällig für Pilzkrankungen, Virusinfektionen und Bakterienkrankheiten. Widerstandsfähigere Pflanzen nehmen einen züchterisch bedeutenden Stellenwert ein, da der Pestizideinsatz reduziert werden kann und gleichzeitig die Ernterträge sichergestellt werden können. Folgende Publikationen geben einen Überblick über aktuelle Forschungen hinsichtlich der Erarbeitung von Krankheitsresistenten Tomatenpflanzen.

Das „ripening regulated protein DDTFR10/A“ (DDTRF10/A) gehört zu der Genfamilie der „Ethylen-Response-Element-Binding-Protein“ (EREBP)-Genfamilie und wurde mittels des Genome Editing-Verfahrens von CRISPR/Cas9 untersucht. Das Gen ist bereits hinsichtlich des Reifeprozesses von Tomatenfrüchten bekannt und man weiß, dass reifungsregulierende Proteine ebenfalls an der Pflanzenabwehr beteiligt sind. Es sollte herausgefunden werden, ob DDTFR10/A ein Anfälligkeitgen für *Fusarium oxysporum* (*F.oxysporum*), der Fusarium Welke darstellt. Aus diesem Grund wurde in das potenzielle Anfälligkeitgen eine Mutation eingeführt, die sowohl homo- und heterozygote Mutationen initiierte. Eine 40% geringere Symptomatik der genomeditierten T0-Generation war zu beobachten. Die Anfälligkeit des DDTFR10/A- Gen gegenüber der Fusarium Welke war somit bestätigt, da

nicht mutierte Tomatenpflanzen stärker infiziert waren (Ijaz et al., 2023), p. 3-5. Denselben Sachverhalt boten die Ergebnisse der Studie von Debbarma et al. hinsichtlich zweier Gene, die ebenfalls mit der Anfälligkeit für Fusarium Welke in Verbindung stehen. Es geht um das Gen „Xylemsap protein 10“ (XSP10) und das Gen „Salicylic acid methyl transferase“ (SI-SAMT) deren Herunterregeln zu einer höheren Fusarium-Resistenz führte (Debbarma et al., 2023, p. 2-7).

Die beteiligten Wissenschaftler der Studie von R. Li et al. aus dem Jahre 2022 zeigten erstmals eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber *P. infestans* bei mutierten Empfindlichkeitsgenen, wie „Powdery mildew resistant 4“ (PMR4) in Tomaten. Hierfür wurde ein CRISPR-Cas9-Vektor in zwei weit verbreiteten italienischen Tomatensorten eingeführt: „San Marzano“ und „Oxheart“, um das Empfindlichkeitsgen in entsprechenden Regionen zu modifizieren. Diese Mutation äußerte sich durch reduzierte Krankheitssymptome. Die Rolle des Knock-out-Mutanten des PMR4-Empfindlichkeitsgens wurde hinsichtlich eines Breitspektrumschutzes gegen Krankheitserreger deutlich. Frühere Studien an Tomaten und Kartoffeln bestätigten bereits die Toleranz des ausgeknockten Empfindlichkeitsgens gegenüber Mehltau (R. Li et al., 2022, p. 3-8). Die nähere Untersuchung des Tomaten-PMR4-Gen wurde bereits in der Studie von Santillán Martínéz et al. im Jahre 2020 thematisiert. Des Weiteren wurden PMR4-Mutanten mit vier sgRNAs erzeugt, um statt einer *P. infestans*-Resistenz, eine erhöhte Resistenz gegen das Mehлтаupathogen *Oidium neolycopersici* (On) zu erzielen. Nach der Sequenzierung wurden fünf Mutationsereignisse festgestellt, von denen alle eine reduzierte, jedoch nicht vollständig eliminierte Anfälligkeit gegenüber des Mehltauerregers aufwiesen (Santillán Martínez et al., 2020, p. 1-5).

Eine weitere Studie von Bari et al. von 2021 betrifft das Entgegenwirken von *Phelipanche aegyptiaca* (*P. aegyptiaca*), einem wurzelparasitären Unkraut, das Tomatenpflanzen befällt. CRISPR/Cas9 liefert hierfür einen neuen Ansatz, mit dem das Auskeimen solcher Unkräuter verhindert werden kann. Hierfür wurde eine Punktmutation in dem More Axillary Groth 1 (MAX1) Gen induziert, welches über einen Stoffwechselweg eng mit Strigolactonen (Pflanzenhormone, die als Signalmoleküle agieren) verbunden ist und dessen Produktion durch die Mutation eingestellt wurde. Strigolactone spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Pflanzen und wurzelparasitären Unkräutern. Wenn MAX1 in der Tomate durch CRISPR/Cas9 ausgeschaltet wird und keine Strigolactone produziert werden, können die wurzelparasitären Unkräuter eine potenzielle Wirtspflanze nicht mehr erkennen. Dadurch wird sowohl das Auskeimen als auch der Wurzelbefall verhindert (Bari et al., 2021, p. 2). Ähnliche Ergebnisse resultieren aus einer ebenfalls von Bari et al. durchgeführten Studie aus dem Jahre 2019. Eine CRISPR/Cas vermittelte Mutagenese des Gens

„Carotenoid Cleavage Dioxygenase 8“ (CCD8) wurde genutzt, um eine Wirtresistenz gegen *P. aegyptiaca* in der Tomatenpflanze aufzubauen, indem der Strigolactongehalt durch die CCD8-Mutanten gesenkt wurde. Die Interaktion zwischen CCD8 und Max1 besteht darin, dass CCD8 die Vorläuferverbindungen der Strigolacton-Biosynthese herstellt und MAX1 daraus aktive Strigolactone modelliert. Beide Gene sind bei der Abwehr parasitärerer Unkräuter somit kollektiv beteiligt (Bari et al., 2019, p. 2-3).

In der Studie von Pramanik et al. aus dem Jahre 2021 wurde das CRISPR/Cas9-System verwendet, um gezielt den „*Solanum lycopersicum* Pedicle Elongated locus“ (SIPelo) sowie das den „Mildew resistance locus o1 (SIMlo1) in der Elite-Tomaten-Sorte BN-86 zu verändern, um eine verbesserte Resistenz gegenüber Krankheitserregern zu erreichen. Die Loci tragen die Sensitivitätsgene, die Tomato Yellow leaf curl virus (TYLCV) begünstigen. Es wurden SIPelo-Knockout-Linien erzeugt, die SIPelo deaktivierten. Anhand der SIPelo-Mutanten wurde bestätigt, dass die Ansammlung des Krankheitserregers TYLCV unterdrückt wurde. Wie dem Namen des Erregers zu entnehmen ist entstehen gelbe Blätter mit Kräuselungen und vermindertem Blätter- und Blütenwachstum sowie Fruchtabfall. Des Weiteren wurden Knockout-Linien für das SIMlo1-Gen generiert. Es konnte eine vollständige Resistenz gegen Mehltau festgestellt werden, bei dem es sich um eine Pilzkrankheit handelt, die auf der Pflanze einen aus Pilzsporen bestehenden, mehlartigen Belag hinterlässt (Pramanik et al., 2021, p. 3).

Der nächste Ansatz, um TYLCV resistente Tomatenpflanzen zu erhalten ist die Herstellung von veränderten Tomatenpflanzen, die das Coat Protein (CP) sowie die Replikase von TYLCV stören können. Das CP bildet die äußere Hülle des Virus. Sobald das Virus in die Tomatenzelle eindringt, um sich zu replizieren, wird das CP erkannt. Die virale Interferenz wurde deutlich durch eine geringe Akkumulation des TYLCV-Genoms in den genetisch veränderten Pflanzen. Die eigentliche Immunität der resistenten Tomatenlinien wurde durch die Anwendung von CRISPR/Cas9 hervorgerufen, indem die CP- und Replikationssequenzen von TYLCV für die Herstellung der entsprechenden gRNAs für Tomatenpflanzen verwendet wurden (Tashkandi et al., 2018, p. 1-4).

Yoon et al. untersuchten im Jahre 2020 mit CRISPR/Cas induzierte, neuartige und sequenzspezifische Mutationen am eucaryotic translation initiation factor (eIF4E1), ob durch Mutationen gesteigerte Resistenzen gegenüber Potyviren, wie potato virus V oder pepper mottle virus (PepMoV) bewirkt werden können. In Tomaten ist die eIF4E-Gen-Familie für Potyviren essenziell, um ihren Lebenszyklus aufrechtzuerhalten, weshalb Modifikationen zu Resistenzen führen sollen. Die Resistenz gegen eines der Potyviren konnte eindeutig belegt werden. Nach der Infizierung mit PepMoV entstanden keine Viruspartikel. Die Studie

weist einen CRISPR/Cas-Ansatz nach, der zur Beschleunigung von verbesserten Tomatenmerkmalen in der Züchtung nützlich ist (Yoon et al., 2020, p. 635-635).

Die Entwicklung von wirksamen Abwehrmechanismen gegenüber bestimmten Pflanzenkrankheiten führt meistens dazu, dass sich die Anfälligkeit für eine andere Krankheit erhöht. In der Studie der Forschungsgruppe von Ortigosa et al. wurden 2019 Studienergebnisse vorgestellt, bei denen die Abhängigkeit von unterschiedlichen Abwehrmechanismen in Tomaten entkoppelt werden konnte. Das war durch die Anwendung der CRISPR/Cas-Technologie möglich. Es wurden Tomatensorten konstruiert, die gegen die bakterielle Fleckenkrankheit resistent sind, ohne dabei die Resistenz gegen andere Krankheitserreger zu beeinträchtigen. Es stellte sich heraus, dass der bakterielle Befall in Tomatenblättern von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (PtoDC3000) ausgeht. Das Bakterium produziert das Phytotoxin Coronatin (COR), was das Öffnen der Stomata (besteht aus Schließzellen) begünstigt und somit die Hürde für das Eindringen von *P. syringae* herabsetzt. Für die Öffnung der Stomata ist der Co-Rezeptor „Arabidopsis Jasmonate ZIM-Domain Protein 2“ (AtJAZ2) erforderlich.

Das funktionelle Gegenstück von AtJAZ2 stellt „*Solanum lycopersicum* Jasmonate ZIM-DomainenProtein 2“ (SlJAZ2) dar und musste identifiziert werden, um durch die Anwendung der CRISPR/Cas9-Technologie eine Veränderung in SlJAZ2 erzeugen zu können. Diese Veränderung blockierte das Öffnen der Stomata durch COR und führte zu Resistenz von bestimmten Krankheitserregern, wie gegen *P. syringae*. Die Resistenz des Grauschimmelpilzes *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) wurde durch den Trade-off der Abwehrmechanismen nicht gefährdet (Ortigosa et al., 2019, p. 665-669). Ein weiterer Weg, der zur *B. cinerea* Resistenz führt, zeigt die Studie von Perk et al. von 2023, die das Gen „*Solanum lycopersicum* Phospholipase-C2“ (SIPLC2) als Sensitivitätsgen für *B. cinerea* einstufte und es somit unter Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems inaktivierte. Durch die anfälligkeitsfördernde Eigenschaften des Gens SIPLC2 gegenüber *B. cinerea*, konnten Tomatenlinien mit inaktiviertem SIPLC2-Gen kleinere nekrotische Bereiche aufweisen und zu einer erhöhten Resistenz gegen den Grauschimmelpilz führen (Perk et al., 2023, p. 2-5). Dasselbe Prinzip wurde in der Studie von García-Murillo et al. für den Schadorganismus *Clavibacter michiganensis* (*C. michiganensis*), der die bakterielle Ringfäule verursacht, durchgeführt. Dafür wurde das Gen „*Solanum lycopersicum* Pathogenesis-Related-Gene 1“ (SlPR1) ausgeknockt, wodurch eine höhere Resistenz gegen den Erreger bewirkt werden konnte (García-Murillo et al., 2023, p.3-4).

Veränderung der Abiotische Belastbarkeit

Die Fähigkeit von Sorten sich an unterschiedliche Anbau- und Umweltbedingungen, wie steigenden Temperaturen oder unbeständige Klimaverhältnisse anzupassen ist aus züchterischer Sicht von großem Interesse. Die zukünftige Anforderung an Sorten besteht somit darin, hohe Toleranzen gegenüber Hitze, Kälte, Trockenheit oder Salzgehalt aufzuweisen. Solche Sorten werden in großem Maße nachgefragt sein.

In der Studie von Tran et al. von 2021 wurde die CRISPR/Cas-Technologie mit einem Multiplexansatz eingesetzt, um das „Solanum lycopersicum hybrid proline-rich protein 1“ (SIHyPRP1) genetisch zu verändern. Das Protein begünstigt eine negative Reaktion der Tomatenpflanze, sofern sie einer salzhaltigen Umgebung ausgesetzt ist. Das CRISPR/Cas System verursacht Doppelstrangbrüche der Proteinsequenz, die für eine geringe Salztoleranz verantwortlich ist. Über nonhomologous end joining (NHEJ) Reparaturen wird der Versuch unternommen die Sequenz wiederherzustellen. Die fehlerhafte Reparatur stellt die Indel Mutation/en dar. Diese führen zu einer erhöhten Salinitätstoleranz der Tomatenpflanze (Tran et al., 2021, p. 999-1005). In einer darauffolgenden Publikation von Tran et al. im Jahre 2023 konnte bestätigt werden, dass die präzise Eliminierung der funktionellen Domäne, der proline-rich-domain (PRD) sowie der Eliminierung von acht-Cystein-Motiv (8CM) des SIHyPRP1 die höchstmögliche Salzgehaltstoleranz bei Tomaten aufweist. Zudem sollten neben der Salzgehaltstoleranz, multiple Stresstoleranzen untersucht werden. So zeigten mit CRISPR/Cas9 editierte Tomatenlinien in denen 8CM ausgeknockt wurde eine moderate Hitzetoleranz. Ebenso konnte eine deutlich effektivere Keimung unter Osmose-Stress festgestellt werden, wenn Pflanzen entweder die Domäne mit der entfernten PRD- oder 8CM Variante trugen. Pflanzen mit ausgeknockter PRD-Domäne wuchsen nach 5 Tagen ohne Wasser kontinuierlich weiter (Tran et al., 2023, p. 1-3.) Die Studie von Bouzroud et al. von 2020 untersuchte ebenfalls die Salzverträglichkeit und zusätzlich die osmotische Stressverträglichkeit von Tomaten. Dabei wurde der prognostizierte Einfluss des Gens „Auxin response Factor 4“ (SIARF4) überprüft. Die durch CRISPR/Cas induzierte SIARF4-Mutation erzeugte eine reduzierte Expression von SIARF4, was zu einer geförderten Wurzelentwicklung und -dichte führte. Darüber hinaus konnte eine höhere Salztoleranz durch einen höheren Blattwassergehalt sowie einer erhöhten Toleranz gegenüber osmotischem Stress festgestellt werden (Bouzroud et al., 2020, p. 1-4).

Um die Eigenschaft hinsichtlich der Trockenheitstoleranz zu belegen, untersuchte die Studie von Liu et al. im Jahre 2020 das Gen „Solanum lycopersicum LBD40“ (SILBD40) in der Tomatenpflanze. Das Gen wurde in Wurzeln und Früchten stark exprimiert. Eine Überexpression wurde durch Salz, Polyethylenglykol und Methyljasmonat induziert und führte zu

einer erhöhten Anfälligkeit für Trockenheit. Durch den Trockenstress, der auf die Tomatenpflanze einwirkte, verwelkte sie und verursachte einen erhöhten Wasserverlust. Das gezielte Ausschalten des SILBD40-Gens durch das CRISPR/Cas-System zeigte eine verbesserte Trockenheitstoleranz. Knockout-Pflanzen verwelkten weniger stark und Wasser konnte besser gespeichert werden. SILBD40 stellt bei Tomaten somit einen negativen Regulator dar (L. Liu et al., 2020, p. 1-3). Eine ähnliche Studie, ebenfalls durchgeführt von Liu et al. im Jahr 2019 offenbarte ein weiteres, beteiligtes Gen an der Trockenheitstoleranz von Tomatenpflanzen. Der gezielte Tomatengen-Knockout des Gens „Solanum lycopersicum Nonexpressor of Pathogenesis-Related Gen 1“ (SINPR1) durch CRISPR/Cas, verursachte eine geringere Dürretoleranz der SINPR1-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Somit ist das SINPR1 voraussichtlich an der Regulierung der Trockenheitsreaktion innerhalb der Tomatenpflanzen maßgebend eingebunden (R. Li et al., 2019, p. 2.), Li et al. beschäftigten sich 2018 zudem mit Kältestress in Tomatenpflanzen. Das Knockout des Gens „Solanum lycopersicum C-repeat Binding Factor 1“ (SICBF1) und den daraus entstehenden Mutanten soll die Rolle von SICBF1 während der Abkühlung zeigen. CBF1s gehören in vielen Spezies zu den Kaltreaktionssystemen. So wiesen die Mutanten unter anderem schwerere Kälteverletzungssymptome auf als der Wildtyp. Auch dieses Ergebnis trug zum besseren molekularen Verständnis des SICBF1-Gens hinsichtlich Kühlempfindlichkeit bei Tomaten bei (R. Li et al., 2018, p. 2).

5.2. Erkenntnisse aus Experteninterviews

5.2.1. Ergebnisse der Auswertungsstrategie der Interviews

Aus der finalen Kategorienbildung der drei Interviews ergaben sich insgesamt 4 Hauptkategorien. Deren Ergebnisse werden nachfolgend in Textform paraphrasiert und generalisiert mit gekennzeichnete Zeilennummerierung tabellarisch dargestellt. Die verbleibenden (17) Unterkategorien werden im Folgenden den Hauptkategorien zugeteilt.

5.2.2. Aktueller Stand und zukünftige Bedeutung

Aktuell existieren drei Arten von CRISPR/Cas Genome Edits:

Tabelle 1: Aktueller Stand - Existierende Methoden

Existierende Methoden
Die einfachste Form ist eine Punktmutation im Pflanzengenom einzuführen. Hierbei wird eine einzelne Base durch eine andere Base ersetzt oder eine Base entfernt oder hinzugefügt. Die natürlichen Reparaturmechanismen setzen ein und sind in der Regel sehr genau. Durch Zufall funktioniert der Reparaturprozess nach mehrfachem Schneiden nicht zu 100% richtig und das Resultat ist eine Mutation (Weigel, p. 2, Zeile 10-33).
Es kann ein größeres DNA-Stück (ca. 3000 Basenpaare) durch ein verwandtes ersetzt werden. Ähnliche Sequenzen über einen größeren Bereich des Genoms werden erhalten. Typischerweise wird eine Genvariante durch eine andere Variante desselben Gens ersetzt. In der Züchtung werden ebenfalls Genvarianten kombiniert, weshalb die Anwendung von CRISPR/Cas der Züchtung nahekommt (Weigel, p. 2, Zeile 10-33).
Bei der dritten Anwendungsform wird gezielt Mutagenese eingesetzt um, etwas Neues in das Genom einzufügen, ähnlich wie bei der herkömmlichen Gentechnik. Die Abgrenzung besteht darin, dass die herkömmliche Gentechnik fremde Gensequenzen zufällig und nicht vorhersagbar in das Genom einfügt. Mit CRISPR/Cas werden spezifische Bereiche des Genoms gezielt verändert, um ungewollte Mutationen und Zerstörung anderer Gene zu vermeiden (Weigel, p. 2, Zeile 10-33)

Die Varianten inwieweit CRISPR/Cas das Genom verändern kann wird durch die drei unterschiedlichen Ansätze deutlich. Nachstehend wird das Potenzial der Technologie von den Experten beurteilt.

Tabelle 2: Aktueller Stand - Potenzialeinschätzung der Experten

<p>Potenzialeinschätzung der Experten</p>
<p>Die Technologie ist nicht zu 100% als Revolution wahrzunehmen. Es ist ein Werkzeug, was in der Landwirtschaft und bei einer großen Anzahl von Pflanzenspezies molekular- sowie biotechnologische Möglichkeiten bietet, die viele Jahre zuvor nicht existierten und die für die Wissenschaft unvorstellbar gewesen sind. Es ist unklar wie produktiv CRISPR/Cas sein wird und welche Forschungsgegenstände aus dem System geschöpft werden können. Man steht am Anfang von vielversprechenden Lösungen. Die Publikationszahlen zu anwendungsbezogenen Arbeiten, sind in kurzer Zeit enorm gestiegen (Weinl, p. 3, Zeile 7-19).</p>
<p>Vor der Entdeckung von CRISPR/Cas war Genom-Editierung sehr beschränkt möglich. Durch CRISPR/Cas hat sich Genom-Editierung einen höheren Stellenwert in den Größenordnungen Geschwindigkeit, einfache Handhabung und der Möglichkeit in nahezu jedem Labor eingesetzt werden zu können, erarbeitet. Gezielte Mutationen (Genome Edits) in großem Maßstab im Genom hervorzurufen eröffnet vollkommen neue Perspektiven (Weigel, p. 2, Zeile 2-8).</p>
<p>Pflanzen haben eine hohe (phänotypische) Plastizität, sodass es im Normalfall nicht ausreicht an einer Stelle eines Genabschnittes zu modifizieren, um eine einzelne veränderte Eigenschaft zu erzielen. Liegt ein spezielles Gen, das eine gewollte Eigenschaft trägt, in einer 1:1 Beziehung vor, ist CRISPR/Cas schnell, präzise und das Mittel der Wahl (Weinl, p. 2, Zeile 17-25).</p>
<p>CRISPR/Cas ist ein weiteres Werkzeug in der Züchtung. Es handelt sich um keine Panacea. Es ist nicht 100-mal einfacher geworden, nicht alle Probleme der Landwirtschaft sind gelöst. Ohne den Einsatz von CRISPR/Cas würde die Menschheit nicht verhungern (Weigel, p. 3, Zeile 13-18).</p>
<p>Die Weiterentwicklung des Potenzials von CRISPR liegt in den Händen von Entscheidungsträgern wie Ministerien. Es besteht die Gefahr eines Auseinanderdriftens zwischen den Entscheidern und denjenigen, die die Arbeit verrichten. Das führt dazu, dass Lösungen nicht effektiv vorangetrieben werden und das Potenzial nicht ausgeschöpft werden kann (Kumlehn, p. 10 Zeile 34-35, p. 11, Zeile 1-4, 9-11).</p>

Key Message: Die Technologie weist ein starkes Potenzial auf. Ihre Produktivität und Anwendungsmöglichkeiten müssen jedoch noch weiter erforscht werden. Es existieren bereits zahlreiche wissenschaftliche Publikationen zu diesem Thema. Im Vergleich zu herkömmlichen Züchtungsmethoden zeichnet sie sich durch ihre Präzision und Schnelligkeit aus. Die Herausforderung besteht darin, die Ziel-Gene, die für die gewünschten Eigenschaften verantwortlich sind zu identifizieren sowie ihre korrekte Position im Pflanzengenom zu bestimmen. Die CRISPR/Cas Technologie entscheidet nicht über das Überleben der Menschheit.

Der Erfolg einer Technologie ist immer nur so groß, wie die Nachfrage es zulässt und hängt von derer ab, die sie anwenden und nutzen sollen, weshalb die allgemeine Akzeptanz von CRISPR/Cas maßgeblich zum aktuellen Stand beiträgt.

Tabelle 3: Aktueller Stand - Gesellschaftliche Akzeptanz

Gesellschaftliche Akzeptanz
Es ist bedeutend, dass gesellschaftlicher Konsense gefunden- und entschieden wird, ob Europa CRISPR/Cas, als ein funktionierendes Werkzeug einsetzen möchte (Weigel, p. 3, Zeile 18-20).
Die EU bevorzugt den Verzicht auf Gentechnik im direkten Anbau auf Feldern. Dennoch toleriert und akzeptiert sie den Import von "billiger" gentechnisch hergestellter Soja aus anderen Ländern zur Verfütterung an europäische Nutztiere. Der direkte Anbau solcher gentechnisch veränderten Sorten ist jedoch nicht erlaubt (Weigel, p. 6, Zeile 20-28).
Der Organismus wird bei beiden Methoden verändert sowohl bei der Züchtung als auch bei CRISPR/Cas. Die Züchtung wird akzeptiert, obwohl der Effekt bei CRISPR genau derselbe ist (Weinl, p. 8, Zeile, 13-18).
Eine höhere Akzeptanz für die Anwendung von CRISPR/Cas könnte erreicht werden, indem Lebensmittel, wie die Kartoffel zunächst in der stofflichen Produktion, wie der Papier- und Stärkeindustrie, eingesetzt werden. Wenn durch gezielte Veränderungen eine bessere Verarbeitbarkeit erzielt wird, könnte dies zu einer breiteren Akzeptanz führen. Die langfristige Anwendung zeigt, dass von der Technologie keine Gefahr ausgeht und die Sicherheit gewährleistet ist. Dadurch könnte eine Annäherung an die Lebensmittelproduktion erfolgen. Die Thematik ist für Verbraucher komplex, und es fällt schwer, alle Zusammenhänge zu erfassen (Weinl, p.6, Zeile 11-28).

Es war fraglich die Neue Gentechnik als erstes mit Herbizidresistenzen, wie beim CIBUS-Raps anzuwenden, zu entwickeln und in den öffentlichen Umlauf zu bringen, denn für die Öffentlichkeit ist die Thematik schwer vermittelbar und einheitlich negativ belegt. Mit dem Wort „Herbizid“ wird Gift assoziiert, was prädestiniert für eine Negativ-Diskussion ist. Öffentlichkeitsstrategisch sind falsche Weichen gestellt worden, wenn Vorurteilen statt wissenschaftlichen Fakten Glauben geschenkt wird (Kumlehn, p.4, Zeile 4-18).

Pflanzen haben Krankheiten. Menschen nehmen Medizin ein, Pflanzen benötigen Pflanzenschutzmittel, das müsse zunächst akzeptiert werden. Die in der Gesellschaft herrschende „Chemophobie“ verhindert die objektive Betrachtung des Ausbringens von Pflanzenschutzmitteln und der Entwicklung von Herbizidresistenzen mit CRISPR/Cas (Kumlehn, p. 6, Zeile 8-12).

Alle Produkte (pflanzlich-/tierischen), die der Mensch aus der Landwirtschaft zieht, sind genetisch massiv verändert. Die Diskussion um genetische Veränderungen steht somit vollständig im Widerspruch. Experten sind sich dessen bewusst und wissen, dass ein Fortschritt nicht ohne genetische Veränderungen einhergehen kann. Ein Fortschritt will immer ökonomisch und profitabel genutzt werden. Für landwirtschaftliche Produkte wird das oft nicht eingesehen, dass Pflanzen mit einer hohen Qualität und einem hohen Nutzungswert auch absatzstark vertrieben werden wollen (Kumlehn, p. 6, Zeile 17-34).

50% aller importierter Waren sind gentechnisch verändert und der Import ist durch aufwändige Zulassungsverfahren genehmigt. Die fehlende Transparenz sorgt dafür, dass die Bevölkerung nicht darüber aufgeklärt ist, welche Mechanismen bei der Wareneinführung greifen (Kumlehn, p. 14, Zeile 3-4).

Key Message: CRISPR/Cas wird in der Landwirtschaft kontrovers diskutiert. Die EU bevorzugt den Verzicht auf Gentechnik im direkten Anbau, erlaubt aber den Import gentechnisch hergestellter Futtermittel. Die Technologie ermöglicht gezielte Veränderungen in Pflanzen und Tieren, was auf Zustimmung und Bedenken stößt. Eine breitere Akzeptanz könnte erreicht werden, wenn das System zunächst in anderen Bereichen, wie der stofflichen Produktion eingesetzt wird. Die Debatte ist komplex und durch Vorurteile geprägt. Es ist wichtig, wissenschaftliche Fakten zu berücksichtigen und die Bevölkerung transparent zu informieren.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse zu der Relevanz der Anwendung aus klimatischen Gesichtspunkten aufgeführt, was eine der wissenschaftsgeriebene Haupt-motivationen darstellt, CRISPR/Cas anwenden zu wollen.

Tabelle 4: Aktueller Stand - Klima

Klima
Jedes Werkzeug, das zur Verfügung steht, sollte hinsichtlich Klimakrise und vielen anderen Krisen, mit denen die Menschheit zu tun hat, eingesetzt werden. Der eingesparte Aufwand stellt Mittel dar, die an anderer Stelle unbedingt erforderlich sind (Weigel, p. 3, Zeile 22-25).
Der Klimawandel verläuft deutlich langsamer als in der Öffentlichkeit dargestellt. Es ist offensichtlich, dass der Mensch klimatisch Einfluss nimmt, weshalb Pflanzenzüchtung immer präpariert sein sollte, um für zukünftig, klimatische Eventualitäten Lösungen bereitstellen zu können (Kumlehn, p. 7, Zeile 3-7).
Wird es wärmer, treten in Teilen der Erde ortsuntypische Pathogene auf, wie Rostkrankheiten in Europa. Eine laufende Züchtung gegen Rostkrankheiten existiert bereits. Mit ausschließlicher Crop-Leistung ist nichts mehr gewonnen. Die Ertragsstabilität nimmt immer mehr Gewichtung ein. 5-10% weniger Gesamtertrag, reichen aus, um jährlich einen gleichmäßigen Ertrag zu erreichen (Kumlehn, p. 7, Zeile 14-28).

Key Message: Die Interviewaussagen präsentieren, dass alle verfügbaren Werkzeuge zur Bewältigung von klimatischen Veränderungen einzusetzen ist. Der eingesparte Aufwand wird dringend woanders benötigt. Pflanzenzüchtung sollte darauf vorbereitet sein, Lösungen für zukünftige klimatische Veränderungen zu bieten. Der Fokus sollte nicht ausschließlich auf der Ertragsleistung liegen, da auch die Ertragsstabilität entscheidend ist.

Zum aktuellen Stand von CRISPR/Cas gehört ebenfalls die Identifizierung der Gene, die einzelnen Pflanzeigenschaften exprimieren, die in aktueller Forschung und für die Zukunft eine große Gewichtung einnehmen. Nachfolgend wird eine aus den Interviews entstandene, kurze Übersicht der angesprochenen Eigenschaften skizziert, deren Optimierung einen Mehrwert für die Landwirtschaft bietet:

Tabelle 5: Aktueller Stand - Optimierte Pflanzeigenschaften

Optimierte Pflanzeigenschaften durch Ermittlung von Gen-Funktionen
Ein weiteres, aktuelles Anwendungsbeispiel von CRISPR/Cas bezieht sich in der Grundlagenforschung auf die detaillierte Überprüfung der Funktion von Genen, bei denen eine Schlüsselrolle für Pathogen-Abwehr, Wachstum und Anpassung an die Umgebung einer Pflanze vermutet wird (Weigel, p. 3, Zeile 1-5).
Am IPK existiert die größte Genbank Europas mit der größten Pflanzensammlung von Kulturpflanzen und Verwandten der Kulturpflanzen. WissenschaftlerInnen arbeiten mit diesem Material, um herauszufinden, wie spezielle Pflanzen funktionieren, an welchen Positionen im Pflanzengenom Gene mit Eigenschaften vorliegen, die für neue Sorten relevant sind. Sobald auf solche Gene gestoßen wird, lässt sich mit CRISPR/Cas ausschließlich dieser Genzustand übertragen. Das ungewollte, ursprünglich gekoppelt Genmaterial bleibt zurück. CRISPR/Cas befähigt solche gekoppelte Gene voneinander zu trennen, was durch klassisches Kreuzen nicht möglich gewesen wäre (Kumlehn, p. 9, Zeile 1-10).
Das IPK arbeitet intensiv daran mit CRISPR/Cas Virus- und Pilzresistenzen zu entwickeln. Ergebnisse zu Virusresistenzen in Pflanzen sind vielversprechend, die Entwicklung von Pilzresistenzen ist bisher weniger fortschrittlich. Bisher konnte ein Resistenzefekt aus historischem Material gewonnen werden (Kumlehn, p. 7, Zeile 31-32, p. 8, Zeile 5-8, 10-13).
Neben der Pathogen-Abwehr sind Nutzungseffizienz von Ressourcen sowie Reduktion toxischer Substanzen innerhalb von Pflanzen relevant. Im Hinblick auf klimatische Verschlechterungen ist es sinnvoll Pflanzen zu haben, die zu einem besseren Umgang mit Trockenheit- und einer vermehrten Produktion von Biomasse unter suboptimaler Wasserversorgung führen (Kumlehn, p. 9, Zeile 20-28, p.21, Zeile 1-10, 20-27).

Key Message: CRISPR/Cas wird am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in verschiedenen Bereichen der Pflanzenforschung eingesetzt. Dabei geht es um die Erforschung von Genfunktionen für Pathogen-Abwehr und Wachstum, die Entwicklung von Resistenz gegen Viren und Pilze, die Verbesserung der Ressourcennutzungseffizienz bei Trockenheit und die Reduktion toxischer Substanzen in Pflanzen.

In der nachfolgenden, zweiten Kategorie sind die Ergebnisse der beiden Lebensmittelbeispiele zur Anwendung von CRISPR/Cas dargestellt. Im Fokus steht die Veränderung agronomischer Eigenschaften, die Veränderung von Nahrungsmitelegenschaften und die Produktion von Industrierohstoffen.

5.2.3. Lebensmittelbezogene Anwendungsbeispiele

Tabelle 6: Anwendungsbeispiel - Kartoffel

CRISPR-veränderte Kartoffeln
Bei der Kartoffel ist davon auszugehen, dass der Weg zum direkten Verzehr über den technischen Bereich laufen wird. Die mit CRISPR/Cas veränderten Kartoffeln würde somit vorerst als Industriekartoffel verwendet werden, wobei Erfahrungen gesammelt werden könnten (Weinl, p.8, Zeile 30-35).
CRISPR/Cas könnte in der Kartoffelzüchtung vor allem für die Produktion von Stärke oder anderen Inhaltsstoffen verwendet werden, da Konsumenten in der Regel nur zwischen fest- und weichkochenden Sorten unterscheiden. Es gibt Erfahrungen mit gentechnisch veränderten Kartoffeln, daher ist zu erwarten, dass die Einschätzung für genomeditierte Kartoffeln ähnlich sein wird (Weigel, p. 8, Zeile 31-35, p. 9 Zeile 1, 3-4).
Die Kartoffel hat für Europa den Stellenwert eines Grundnahrungsmittels. Für den Rest der Welt gilt sie als Gemüsebeilage. Die sekundäre weltweite Relevanz der Kartoffel liegt auf Industriebene, wenn es um Sektoren, wie Pommes- und Chips Produktion geht. Industrieanwendungen für Kartoffeln bestehen durchaus (Kumlehn, p.23, Zeile 13-18).
Die Kartoffelsorte Renate wurde durch ungerichtete Mutagenese erzeugt und aufgrund ihrer guten sensorischen Eigenschaften für Pommes Frites zugelassen. Später wurde sie wegen einer zu hohen Solanin Produktion vom Markt genommen. Mit CRISPR/Cas könnte eine neue Kartoffelsorte entwickelt werden, bei der die unerwünschte Solanin

Produktion entkoppelt ist, und nur die gewünschten geschmacklichen Eigenschaften übertragen werden (Kumlehn, p. 24, Zeile 31-35, p. 25, Zeile 1, 12-18)].

Die Anwendung von CRISPR/Cas für den Kartoffelanbau könnte von besonderer Bedeutung sein, insbesondere zur Bekämpfung der Kraut- und Knollenfäule (*P. infestans*). Die BASF hat bereits eine klassisch transgene Lösung entwickelt, bei der Resistenzgene in historisches Kartoffelmaterial eingeführt werden. Die transgene Kartoffel erwies sich als resistent, während die konventionelle Kartoffel geschädigt wurde. Die resistente Kartoffelsorte wurde möglicherweise aus Gründen fehlender Akzeptanz oder unzureichender Leistungsfähigkeit nicht weiterverfolgt (Kumlehn, p. 25, Zeile 21-35).

Auf einem Versuchsgut in Nordrhein-Westfalen wurden sowohl resistente als auch nicht resistente Kartoffelzellen, gezielt mit *Phytophthora* infiziert. Während der Präsentation der *Phytophthora*-Infektion wurden auch Privatpersonen auf die Möglichkeit der Nutzung transgener Kartoffeln für den Privatgebrauch aufmerksam. In diesem Kontext spielten bestehende Gesetze und EU-Richtlinien für die Konsumenten keine entscheidende Rolle. Vielmehr war der ausschlaggebende Faktor der deutliche Vorteil, den die resistente Kartoffel zur Bekämpfung von *Phytophthora* bieten könnte (Kumlehn, p. 26, Zeile 3-7).

Key Message: Aus vorstehenden Ergebnissen geht verallgemeinernd hervor, dass sich die CRISPR/Cas-Technologie hinsichtlich der Kartoffel insbesondere in der stofflichen Produktion und in der Bekämpfung der Kraut- und Knollenfäule eignen würde. Die Technologie könnte vorerst als Industriekartoffel genutzt werden, um Erfahrungen zu sammeln. Die Entwicklung von neuen Kartoffelsorten, die unerwünschte Eigenschaften entkoppeln, wie zum Beispiel die Solanin Produktion von den gewünschten Geschmackseigenschaften, wäre möglich.

Es folgen die Interview Ergebnisse zu durch CRISPR/Cas genetisch veränderte Tomaten.

Tabelle 7: Anwendungsbeispiel - Tomate

CRISPR-veränderte Tomaten
Der Lebensmitteleinzelhandel bietet bereits viel Variation an Tomatensorten, weshalb davon auszugehen ist, dass KonsumentInnen auf eine neue Tomate mit einem bestimmten Vorzug ansprechen würde und die Tomate schnell erfolgreich sein könnte (Weigel, p. 8, Zeile 24-31).
Die GABA-Tomate ist ein genomeditiertes Produkt, das mithilfe der CRISPR/Cas-Technologie hergestellt wurde. Durch gezielte Genbearbeitung wurde der Gehalt an Gamma-Aminobuttersäure (GABA) in der Tomate um das Fünffache erhöht. GABA wird als potenziell gesundheitsfördernd betrachtet, jedoch fehlen klare wissenschaftliche Belege für beruhigende, stressreduzierende oder blutdrucksenkende Wirkungen. Die Anti-Stresstomate ist keine revolutionäre Lösung für globale Probleme (Kumlehn, p. 5, Zeile 17-29).
Gezielte Anwendungsbereiche in Tomaten hat das Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen in Münster bisher in wissenschaftlicher Kooperation mit einer brasilianischen Arbeitsgruppe aus São Paulo auf den Weg gebracht. Ziel der Untersuchung war es bekannte Allele aus der kommerziellen Anwendung und aus dem Landbau in einer Wildtomate so zu modifizieren, dass die Domestizierung der Wildtomate direkt durch die Anwendung von CRISPR/Cas realisiert– und der zeitaufwändige Umweg durch Züchtung eingespart werden konnte. Somit wurden Größe und Nährstoffgehalt der Tomate verändert (Weinl, p. 1, Zeile 15-31).
Der zuvor beschriebene Sachverhalt betrifft das Experiment "De novo Domestication of Wild Tomato using Genome Editing". Dabei wurden gleichzeitig fünf verschiedene Eigenschaften verändert, indem mehrere Allele gleichzeitig bearbeitet wurden, was zu einem zeitlichen Vorteil führte. In der konventionellen Züchtung wäre dies äußerst schwierig umzusetzen (Weinl, p.7, Zeile 7-17).
Konkret kann der Gehalt von Inhaltsstoffen erhöht werden, indem der Stoffwechselweg beeinflusst wird. So könnte ein Inhaltsstoff in der Tomate während der Wachstumsphase und der darauffolgenden Ausprägungsphase hochgefahren und damit quantitativ vermehrt produziert werden. Das macht Sinn, sofern während der Prozessierung durch Hitze oder Druck ein Inhaltsstoff drastisch abgebaut wird. In der Produktion würde man mit

einem höheren Ausgangsgehalt starten und gleichzeitig trotz des unvermeidlichen Abbaus mit einem höheren Gehalt des Stoffes im Produkt ankommen (Weinl, p. 7, Zeile 30-35, p. 8, Zeile 1-7).

Es wird der Hauptvorteil zu sehen sein, dass mit CRISPR/Cas Inhaltsstoffe verändert werden. Eigenschaften zu beeinflussen, von denen viele unterschiedliche Faktoren abhängen, wie Ertrag und Trockenheitsresistenz, die schwieriger umsetzbar sind. In der Züchtung werden Eigenschaften im Prozentbereich verändert. Wenn eine Tomate 10-mal oder 100-mal mehr gesundheitsfördernden Inhaltsstoff produziert, sind 2% - 3% weniger Ertrag nebensächlich, da pro Produkteinheit 20% - 40% mehr verlangt werden kann. Insofern sind qualitative Merkmale den quantitativen vorzuziehen (Weigel, p. 8, Zeile 6-18).

Key Message: Die essenziellen Ergebnisse zu mit CRISPR/Cas modifizierten Tomaten liegt einerseits bei der GABA-Tomate, die mithilfe der CRISPR/Cas-Technologie hergestellt wurde und als erstes genomeditierte Produkt eine Marktzulassung erhalten hat. Es konnte eine fünfmal erhöhte Menge an Gamma-Aminobuttersäure (GABA) erreicht werden. GABA wird als potenziell gesundheitsfördernd betrachtet. Dennoch sind keine klaren und wissenschaftlichen Belege für ihre stressreduzierende oder blutdrucksenkende Wirkung bekannt. Das Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen in Münster hat erfolgreich bekannte Allele aus kommerziell genutzten Tomaten in Wildtomaten eingeführt, um Größe und Nährstoffgehalt zu modifizieren. Das CRISPR/Cas-System ermöglicht eine gezielte Veränderung von Inhaltsstoffen, was für die Lebensmittelproduktion einige Vorteile verspricht. Hierbei liegt der Fokus auf qualitativen, statt quantitativen Merkmalen, weil diese einen höheren Mehrwert für die Verbraucher bieten.

Die nachstehend aufgeführten Vorteile der CRISPR/Cas Technologie gelten für die Kartoffel und die Tomate ebenso wie für andere genomeditierte Pflanzen durch die CRISPR/Cas-Technologie.

Tabelle 8: Anwendungsbeispiel - Vorteile

Vorteile
Es lässt sich präzise und gezielter arbeiten, was zum schnelleren Erreichen der Lösung führt (Kumlehn, p20, 32-34).
Es können wissenschaftliche Fragestellungen schneller realisiert werden und es kann zu einer schnelleren Anwendung kommen. Klassische Züchtungsmethoden hingegen benötigen auch durch lange Generationszeiten Jahrzehnte lang bis eine Umsetzung möglich ist (Weinl, p.7, Zeile 17-21).
Resistenzen aus historischem Material in moderneres Material einzukreuzen ist schwierig, da schlechte Eigenschaften des historischen Materials in das moderne Material überführt werden. Es dauert zwei bis drei Jahrzehnte, bis die ungewollten Eigenschaften rückgekreuzt sind. Genom-Editierung umgeht dieses Hindernis und bringt den entscheidenden Vorteil einen bestimmten Genzustand zu übertragen, sofern dieser bekannt ist (Kumlehn, p. 8. 22-35, p. 9, Zeile 1).
Es benötigt nur zwei Generationen der ursprünglich mit CRISPR/Cas beimpften Pflanzenzelle, um ein vollständig neues Pflanzenprodukt zu erhalten (Weinl, p.2, Zeile 35-36, p. 3, Zeile 1). Die Enzyme fallen heraus und sind nicht mehr nachweisbar (Weinl, p. 13, Zeile 32).
Es lässt sich die Funktionsfähigkeit von einer Genvariante für viele verschiedene Sorten einfach und schnell überprüfen, denn nicht jede Genvariante funktioniert gleich gut in jeder Sorte. Dies stellt einen weiteren Vorteil dar, der den Erhalt der lokalen genetischen Diversität betrifft (Weigel, p. 7, Zeile 12-24).

Key Message: Die präziserer und schnellere Lösungsfindung steht, im Vergleich zur klassischen Züchtung erneut im Vordergrund. Unerwünschte Eigenschaften aus historischem Material können umgangen werden. Die Funktionsfähigkeit von Genvarianten ist einfach zu überprüfen, sodass die genetische Vielfalt besser erhalten bleiben kann.

Die Frage, ob sich genomeditierte Tomaten für den direkten Verzehr oder für die Weiterverarbeitung eignen beurteilen folgende Aussagen.

Tabelle 9: Anwendungsbeispiel - Direkter Verzehr oder weiterverarbeitete Produkte

Direkter Verzehr oder weiterverarbeitete Produkte
Tomaten, die mit CRISPR/Cas hergestellt werden eignen sich primär für den direkten Verzehr, da es wahrscheinlicher ist, dass qualitative Unterschiede erzeugt werden. Bei weiterverarbeiteten Produkten, wie zum Beispiel Tomatenmark sind Ertrag und feste Inhaltsstoffe Parameter, die gemessen werden und Ziel quantitativer Züchtung sind. Ähnlich wäre es bei Raw-Crops, wie Mais und Weizen (Weigel, p. 10, Zeile 6-10).
Keiner der beiden Anwendungsmöglichkeiten, sowohl die des direkten Verzehrs als auch die der Weiterverarbeitung von mit CRISPR/Cas hergestellten Tomaten ist relevanter als die andere einzuschätzen. Je nach Fragestellung ist es ohne Vorbehalte zu befürworten, genetisch veränderte Tomaten, direkt der Ernährung zuzuführen oder weiterzuverarbeiten (Kumlehn, p. 27, Zeile 9-10, 15-16).
Während des Herstellungs- und Weiterverarbeitungsprozesses von mit CRISPR/Cas veränderten Tomaten sind keine gesonderten Maßnahmen oder spezielle Faktoren von Bedeutung, die im Lebensmittelbetrieb zu beachten sind (Weinl, p.14, Zeile 26-33).

Key Message: Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass sich mit CRISPR/Cas hergestellte Tomaten hauptsächlich für den Direktverzehr eignen, da eher qualitative Unterschiede adressiert werden. Bei der Weiterverarbeitung wird tendenziell quantitative Züchtung angestrebt. Je nach Fragestellung müssen die Anwendungsmöglichkeiten nach Bedürfnissen und Zielen ausgerichtet werden.

Im weiteren Verlauf wird die Sicherheit des CRISPR/Cas-Systems hinsichtlich der Anwendung bei Pflanzen und daraus potenziell entstehenden Lebensmitteln näher beleuchtet. Die Lebensmittelsicherheit stellt die dritte Kategorie der interviewbasierten Ergebnisse dar.

5.2.4. Lebensmittelsicherheit

Tabelle 10: Lebensmittelsicherheit - Allgemein

Allgemein
Die Lebensmittelsicherheit von mit CRISPR/Cas hergestellten Pflanzen ist nicht gefährlicher als jede andere Züchtungsmethode auch. Sie sind von einem Wild-Typ oder einer anderen Pflanze nicht zu unterscheiden, denn außer der Mutation verbleibt nichts im Organismus. Die Mutation hätte rein theoretisch auf natürlichem Wege entstehen können. Der Fokus liegt allein auf der Veränderung der Eigenschaften, die nach sorgfältiger Anwendung, keinen weiteren Nebeneffekt erzeugen (sollten) (Weinl, p.11, Zeile 13-28).
Heute weiß man sehr viel über Gene. Die Wahrscheinlichkeit inwieweit ein Problem auftreten könnte ist sehr gut einschätzbar. Wird gezielt ins Genom eingegriffen, um die Resistenz gegen einen Schädling zu erhöhen, erfolgt das mit einem Gen, dessen Funktionsweise, auf welche Weise die Resistenz zustande kommt, bekannt ist. Dadurch ist die Lebensmittelsicherheit von Genome Edits höher als die von konventionellen Züchtungsverfahren (Weigel, p. 10, Zeile 15-29).

Key Message: Der allgemeine Abschnitt zeigt Statements, in denen die Lebensmittelsicherheit von den Experten als positiv eingestuft wird.

Nachfolgend sind die Ergebnisse zu Risiken, hinsichtlich der Lebensmittelsicherheit aufgeführt.

Tabelle 11: Lebensmittelsicherheit - Risiken

Risiken
Bei der konventionellen Züchtung erkennt man schnell, dass durch Kreuzung verschiedener Sorten Millionen von Interaktionen zwischen noch nie getesteten Genen resultieren. Es werden 1000de von Genen zeitgleich verändert. Die Wahrscheinlichkeit und das damit verbundene Risiko, dass an dieser Stelle neue Effekte entstehen, ist viel größer als bei Genschnitttechnologien, wie CRISPR/Cas, bei dem ein einzelnes Gen verändert wird (Weigel, p.5, Zeile 2-22).
Mit der „Schrotflinte“ ins Genom zu schießen und viele unvorhersehbare Veränderungen zu induzieren, erkläre man für weitgehend sicher. Neue Methoden, bei denen im Detail vorhersehbar ist, welche Veränderungen entstehen, werden als gefährlicher hinsichtlich Risiken und des allgemeinen Gefahrenpotenzials eingestuft (Kumlehn, p. 3, Zeile 31-35).
Bei klassischen gentechnischen Verfahren, in denen Fremd-DNA in den Zielorganismus eingebracht wird, wie zum Beispiel bei der T-DNA Insertionen verbleiben Insertionsmarker. Diese lassen sich durch weitere Anschlussverfahren eliminieren. Dieser Nebeneffekt ist somit kontrollierbar. CRISPR/Cas verwendet keine Fremd-DNA. Diese Problematik besteht nicht (Weinl, p.12, Zeile 4-8).
Die Punktmutation wird durch Sequenzieren des DNA-Abschnittes überprüft und es bedarf keines weiteren Schrittes. Es besteht nicht die Gefahr eines Fremd-DNA Rückstandes (Weinl, p. 12, Zeile 8-10).
Auf der methodischen Seite sind keine Risiken zu nennen. Welche Effekte eine Mutation in der Pflanze hervorruft, wird im Experiment während der Bewertung und Überprüfung der Pflanze ersichtlich. Es wird festgestellt, ob die eingeführte Mutation die Merkmale hervorruft, die erzielt werden sollten. Dieser Nachweis ist bei allen Züchtungsverfahren, auch bei klassischen Züchtungen, obligatorisch (Weinl, p. 12, Zeile 17-23).
Im Extremfall besteht das Risiko, dass die gewünschte Eigenschaft mit einer negativen Eigenschaft oder einem toxischen Stoff gekoppelt ist, der daraufhin nachweislich von der angestrebten Mutation getrennt werden müsste. So ein Ausnahmefall ist nicht der

<p>Standard und kann wiederum sowohl bei CRISPR/Cas als auch bei anderen Züchtungsverfahren nicht zu 100% ausgeschlossen werden (Weinl, p. 12, Zeile 23-27).</p>
<p>Jeder der züchterisch arbeitet muss den Erfolg seiner Veränderung nachvollziehbar dokumentieren, bewerten und nachweisen, dass keine negativen Auswirkungen auftreten. Das ist nicht von der Methode abhängig. Da birgt CRISPR/Cas keine zusätzliche Gefährdung (Weinl, p. 12, p.13, Zeile 1-6).</p>
<p>Die Methode, lässt im Nachgang mehr Spielraum für den Evaluierungsprozess zu, der im Idealfall zu einem kommerziell nutzbaren Produkt führt (Weinl, p. 12, p.13, Zeile 6-9).</p>
<p>Das Risiko ist insgesamt sehr gering, weil das Verständnis von Biologie hinsichtlich Genetik und Gentechnik überaus weitreichend ist. Eine Technologie, die zu 100% risikofrei ist gibt es trotzdem nicht. Das Risiko, dass bei der konventionellen Züchtung schädliche Organismen entstehen, ist bereits gering. Mit CRISPR/Cas ist das ohnehin schon geringe Risiko noch geringer und kontrollierbarer (Weigel, p.12, Zeile 1-5)</p>
<p>Das Designen der Kartoffel, würde sie nicht seit Tausenden von Jahren Existieren, wäre unter den Gesichtspunkten der Gentechnik-Diskussion, heute wahrscheinlich nicht zulässig. Die Kartoffel bildet den Giftstoff Solanin, sobald sie Licht ausgesetzt ist. Für Erwachsene kann es zu starken Magenverstimmungen kommen, für Kleinkinder kann es zu neurologischen-, HK- und Atmen Problemen führen. Keiner würde aufgrund dieses Risikos den Verzehr von Kartoffeln unterbinden (Weigel, p. 11, Zeile 4-19, 28-29, 32-34).</p>
<p>Selbstverständlich besteht das Risiko, dass etwas Unvorteilhaftes entsteht. Dieses Risiko ist bei genomeditierten sowie klassisch transgenen Pflanzen nicht höher als bei allen anderen Pflanzen auch (Kumlehn, p.15, Zeile 22-25). Der Ausgangspunkt muss sein, dass jede genetische Veränderung unerwartete Ereignisse hervorrufen kann. Es sollte nicht ausschließlich von Risiken bei genomeditierten Pflanzen gesprochen werden (Kumlehn, p. 17, Zeile 27-28).</p>

Key Message: CRISPR/Cas verwendet keine Fremd-DNA, was das Risiko von Insertionsmarkern und Fremd-DNA-Rückständen eliminiert. Die Risiken sind gering und vergleichbar mit anderen Züchtungsverfahren. Das Risiko bei genomeditierten Pflanzen ist somit nicht höher als bei klassisch transgenen oder anderen Pflanzen. Jede genetische Veränderung birgt potenziell unerwartete Ereignisse. Die Gesamtrisiken bleiben gering und kontrollierbar.

Folgende Tabelle bietet Lösungsansätze in welchem Rahmen identifizierte Risiken überprüft werden müssen.

Tabelle 12: Lebensmittelsicherheit - Risikoprüfung

Risikoprüfung
<p>Der Anbau von gentechnisch veränderten Pflanzen ist in der EU untersagt. Erfahrungswerte in der Nutzung und im Feld sind von großer Bedeutung. CRISPR/Cas ist gut erforscht und große Unterschiede zwischen Labor und Feld werden nicht erwartet. Dennoch muss überprüft werden, ob das Bewährte unter kontrollierten Bedingungen auch im Feld praktikabel ist und die Eigenschaften stabil umgesetzt werden können. Die Statistik legt fest, ob ein Zustand besser als vorher ist. Die größeren Flächen im Feld sind die Bewertungsgrundlage, weshalb Feldversuche für die Produktivitätsprüfung und für den Vergleich mit anderen Methoden unerlässlich sind (Weinl, p.9, Zeile 1-17).</p>
<p>Den rechtlichen Hintergrund außeracht gelassen ist eine Risikoprüfung von mit CRISPR/Cas hergestellten Organismen nicht zwangsläufig erforderlich. Dies begründet sich durch die Methode. Während der Anwendung der Methode wird sichergestellt, dass keine weiteren Mutationen auftreten und der Organismus sicher ist. In der Regel integriert das erforderliche Zulassungsverfahren der jeweiligen Sorte die Abschätzung potenzieller Risiken bereits. Mit der Entscheidung der Zulassung wird bestätigt, dass von der Pflanze keine Gefahr ausgeht (Weinl, p. 14, Zeile 4-11).</p>
<p>Rein wissenschaftlich müsste gesagt werden, dass die Technik akzeptiert, angewendet und zugelassen werden kann und eine Kontrolle nicht erfolgen muss (Weinl, p. 15, Zeile 6-8).</p>
<p>Pflanzen oder Tiere, die durch genetische Veränderungen entstehen, müssen einer Prüfung unterzogen werden. Bei Pflanzen ist es die Sortenzulassung. Gerade bei Risiken, die im Laufe der Zeit, wie das Allergiepotezial, aufkommen, (Kumlehn, p. 17, Zeile 28-33) ist der Ausbau der Sortenzulassung auch für genomeditierte Pflanzen interessant und eine einfache Lösung (Kumlehn, p. 17, Zeile 18-19).</p>
<p>Prinzipien, wie Hazards systematisch ausgeschlossen werden können sind in der Sortenzulassung integriert und könnten erweitert werden. Risiken werden vor der Sortenzulassung immer berücksichtigt, unabhängig davon, auf welche Art und Weise eine genetische Veränderung entstanden ist (Kumlehn, p.16, Zeile 24-33).</p>

Key Message: Feldversuche sind wichtig, damit veränderte Eigenschaften geprüft werden können. Eine zugeschnittene Risikoprüfung für veränderte Organismen, die mit CRISPR/Cas hergestellt wurden ist nicht immer erforderlich, denn die Methode birgt für gewöhnlich keine weiteren ungewünschten Mutationen. Die Sortenzulassung weiter auszubauen könnte potenzielle Risiken abdecken, da sie bereits Gefahren unabhängig von der Art der genetischen Veränderung abdeckt.

Das Prinzip des CRISPR/Cas Systems ist in weiterentwickelten Technologien integriert und angewendet. Nachstehend wird eine dieser Technologien näher im Hinblick auf Sicherheit näher erläutert.

Tabelle 13: Lebensmittelsicherheit - Aufbauende Technologien

Aufbauende Technologien
Seit der Entdeckung der Methode besteht ein fortlaufend technologischer und wissenschaftlicher Fortschritt, hinsichtlich CRISPR/Cas, sodass jüngere Versuche und neuere Anwendungen spürbar präziser sind (Weinl, p.2, Zeile 27-30).
Mit Technologien, wie Prime Editing ist der Zugewinn an Sicherheit deutlich spürbar. Das Hauptproblem war das Auftreten von off-target Mutationen. Hierbei findet die Guide-RNA den zu verändernden Genabschnitt, nimmt die Modifikation vor, verändert jedoch gleichzeitig Genabschnitte, die der Zielsequenz sehr ähnlich sind. Somit birgt die induzierte neue Eigenschaft die Gefahr einen nicht beabsichtigten Effekt hervorzurufen. Prime Editing trifft den Locus, der verändert werden soll viel sicherer als die klassische Methode (Weinl, p. 13, Zeile 15-31).
Die Sicherheit einer Methode hängt stark von dem Verständnis der zugrunde liegenden Prozesse ab. Bei höher entwickelten Verfahren ist es möglich Gene herunterzuregulieren, sodass Mutationen vorhersehbarer werden. Ein anschaulicher Vergleich verdeutlichen Medikamente und ihre Nebenwirkungen. Ein umfassendes Verständnis über die Wirkungsweise eines Medikaments, verstärkt die Sicherheit enorm. Bindet ein Medikament ausschließlich an ein einziges Protein der 30.000 im menschlichen Körper existierenden Proteine, sind die Nebenwirkungen viel vorhersehbarer, als wenn es an 200 verschiedene Proteine bindet (Weigel, p. 12, Zeile 12-22).

Key Message: Weiterentwickelte Technologien, wie Prime Editing bieten einen großen Zugewinn an zusätzlicher Sicherheit durch die Reduktion an auftretenden off-target Mutationen. Der Sicherheitsgrad einer (biotechnologischen) Methode wird maßgeblich dadurch bestimmt, wie gut (molekularbiologische- und biochemischen) Prozesse durchdrungen werden.

5.2.5. Lebensmittelrechtliche Zuordnung

Die lebensmittelrechtliche Beurteilung von CRISPR/Cas stellt die vierte und letzte Hauptkategorie, die aus den Interviews hervorgeht, dar. Zunächst wird die rechtliche Situation auf globaler Ebene dargestellt.

Tabelle 14: Lebensmittelrecht - Umgang mit Genome Edits außerhalb der EU

Umgang mit Genome Edits außerhalb der EU
Länder außerhalb der EU, wie Nordamerika und Kanada, sind ergebnisoffener aufgestellt und besitzen einen klaren technologischen Vorteil. China und Japan haben ihre ideologischen Bedenken gegenüber konventioneller Gentechnik überwunden und sind in dem Bereich der Genom-Editierung führend. Großbritannien hat durch geringere Zulassungshürden ebenfalls die Chance Know-how aufzubauen (Weigel, p. 30-34, p. 6, Zeile 1-15).
Länder, die mit Genom-Editierung nachhaltiger produzieren können und somit Bioqualität, wie China erreichen, haben einen eindeutigen Vorteil gegenüber der Landwirtschaft in Europa (Weigel, p. 6, Zeile 31-34, p. 7, Zeile 1-2).
Deutschland und die EU sind hinsichtlich Genome Editing und CRISPR/Cas bisher nicht zurückgelassen und vom Forschungsstand abgeschnitten. Es existieren weltweit unterschiedliche, wissenschaftsgetriebene Stärken. Dennoch besteht die Problematik der Regulierung. Trotz des Versuchs einer Überarbeitung der Gentechnikgesetzgebung gehen andere Länder deutlich schneller mit der Novellierung vor. In der EU wird Genome Editing ausgebremst (Kumlehn, p. 12, Zeile 16-24).

Key Message: Die EU und Deutschland sind im Vergleich zu anderen Ländern weniger fortschrittlich, während Länder wie China und Japan technologisch führend sind. Die Regulierung in der EU führt zu einer Verzögerung in der Forschung. Viele Länder sind schneller bei der Einführung neuer Gesetze und ziehen daraus ihren Vorteil in der Forschung und Anwendung von CRISPR/Cas.

Im Weiteren bieten die Aussagen der Interviewpartner einen Überblick zu der rechtlichen Situation innerhalb der EU-Grenzen.

Tabelle 15: Lebensmittelrecht - Umgang mit Genome Edits innerhalb der EU

Umgang mit Genome Edits innerhalb der EU
Die Gleichstellung von CRISPR/Cas mit allen anderen gentechnischen Methoden stellt eine enorme Einschränkung für Forschende dar, die sich in Europa anwendungsspezifisch bewegen. Es entstehen große Nachteile gegenüber Ländern, die an Lösungen arbeiten und bei denen die Gesetzgebung zu Genome Edits weniger reguliert ist. In Europa existieren keine anwendungsbezogenen Forschungen (Weinl p. 4, Zeile 34-35).
Das Urteil über die Gleichstellung von genomeditierten Pflanzen mit konventioneller Gentechnik beruht auf einer über 20 Jahre alten Direktive. Der Begriff "Gentechnik" wird heute oft auf modernere Eingriffe beschränkt. Daraus ergeben sich zwei Gruppen mit unterschiedlichem Gefahrenpotenzial. Mutagenese-Verfahren, die das genetische Material einer Pflanze verändern, fallen laut Gesetz unter die Klassifizierung der GVOs. Ungerichtete Mutagenese wird seit Jahrzehnten beanstandungslos angewendet und wird rechtlich mit konventionellen Züchtungsverfahren gleichgestellt. Somit ist das Verfahren von der Gentechnik-Regulierung ausgeschlossen. Zugelassene GVOs können daher in Lebensmitteln ohne spezielle Kennzeichnung enthalten sein (Kumlehn, p. 3, Zeile 15-29, Weigel, p. 13, Zeile 34-35, p. 14, Zeile 1-11, 31-35).
Der Großteil der angebauten Sorten enthält ungerichtete Mutagenese, wovon wir massiv profitieren und die Züchter weiterhin anwenden. Durch den Sonderstatus der ungerichteten Mutagenese werden Organismen, die aus ihr entstehen, als GMOs bezeichnet, werden jedoch nicht reguliert (Kumlehn, p.14, Zeile 21-29).
GVOs, die durch modernere Techniken, wie Genome Editing erzeugt werden, stellen die zweite Klasse von GVOs dar und gelten gemäß dem Urteil als wenig erforscht, es fehlt die ausschlaggebende Erfahrung. Sie müssen reguliert werden. Aus heutiger Sicht ist dieser Sachverhalt nicht nachvollziehbar (Weigel, p. 14, Zeile 11-22).
Bevor das EU-Urteil von 2018 ausgesprochen wurde, gab es ein Vorgutachten von einem Generalstaatsanwalt, der empfahl, Genom-Editierung wie ungerichtete Mutagenese aus der Gentechnik-Regulierung herauszunehmen und gleichzustellen. Der Vorschlag

scheiterte unter anderem aufgrund von sehr aktiven Lobbygruppen (Kumlehn, p.15, Zeile1-10,15-16).

Es gibt keine Rechtfertigung des Urteils des EuGHs von 2018 zu der Gleichstellung von genomeditierten Pflanzen und gentechnisch veränderten Organismen. Genomeditierte Pflanzen insbesondere Organismen, die mit CRISPR/Cas erzeugt werden, sind statt mit Transgenese- einer konventionellen Pflanze gleichzustellen, denn ob die genetische Veränderung durch Züchtung, Selektion oder durch spezifische Veränderungen hervorgerufen wurde, ist nicht unterscheidbar (Weinl, p. 15, Zeile 23-28).

Die starke Abgrenzung zwischen Genome Edits und mutagenisierten Pflanzen stellt eine Aufforderung an die Politik dar, das Gesetz zu überarbeiten, was aktuell, seitens der Politik aufgenommen wird und teilweise auf Zuspruch stößt (Weigel p. 15, Zeile 6-7).

Die Gleichstellung von CRISPR/Cas mit anderen gentechnischen Methoden in Europa führt zu Nachteilen für Forscher im Vergleich zu Ländern die weniger reguliert sind und anwendungsbezogene Forschung betreiben. Dahingehend ist die rechtliche Unterscheidung zwischen genomeditierten Pflanzen und solchen, die durch ungerichtete Mutagenese entstanden sind, ebenfalls fragwürdig.

Wie mit der Kennzeichnung verfahren werden kann, zeigen folgende Interviewergebnisse:

Tabelle 16: Lebensmittelrecht - Kennzeichnung

Kennzeichnung
Der Hersteller und auch der Handel müssen klären, ob eine Kennzeichnung obligatorisch oder freiwillig ist und inwieweit der Verbraucher über die Anwendung der Technologie informiert werden muss. Würde CRISPR/Cas kennzeichnungspflichtig, müsste im Vorfeld durch ein (Routine)-Labor die jeweilige Mutation durch Sequenzierung nachgewiesen werden, was technisch nicht sinnvoll umsetzbar ist (Weinl, p.14, Zeile 34-35, p.15. 1-8).
Die Diskussion um die Kennzeichnungspflicht genomeditierter Produkte unter Forschern, ist kontrovers. Eine Kennzeichnung ist wenig sinnvoll. Vielmehr würde das Potential positiver Kampagnen einen Nutzen bringen, wenn mit Sätzen, wie: „Genome Edits tragen zu gesünderen Inhaltsstoffen in Lebensmitteln bei“ geworben werden dürfte (Weigel, p. 13, Zeile 21-27).
Aus Verbrauchersicht sollte eine Kennzeichnung anfangs da sein. So kann ein Bewusstsein geschaffen werden. Zuletzt entscheidet der Markt, ob eine Einführung lohnend für den Produzenten verkauft- und vermarktet werden kann (Weinl, p. 16, Zeile 5-18).
Europa und Neuseeland sind die einzigen Länder die Genom-Editierung strikt regulieren, während in den meisten anderen Ländern kleine Veränderungen von der Regulierung ausgenommen sind. Eine Veränderung in Europa ist dringend notwendig, da genomeditierte Pflanzen nicht erkannt werden können. Labore, die auf transgene Produkte testen sind nicht in der Lage, genomeditierte Produkte zu identifizieren da die spezifischen Veränderungen bekannt sein müssen, um geeignete Nachweisverfahren entwickeln zu können. Ein widersprüchlicher Rechtsrahmen entsteht indem einerseits der Vertrieb verboten ist und andererseits keine Einfuhrkontrolle dieser Produkte besteht (Kumlehn, p.12, Zeile 27-34, p. 13, Zeile 1-13, 19-24).
Für die Zukunft bedeutet das, dass genomeditierte Produkte nicht ausgeschlossen werden können, weil sie als solche nicht gekennzeichnet sind. Entscheiden sich Unternehmen für eine freiwillige Kennzeichnung, ist eine Überprüfung/Unterscheidung von den restlichen Produkten aktuell unmöglich (Weigel, p. 7, Zeile 2-5).

Key Message: Die Frage der Kennzeichnung von genomeditierten Produkten ist umstritten. Die technische Umsetzung einer Kennzeichnungspflicht für CRISPR/Cas ist herausfordernd und wenig sinnvoll. Ein Bewusstsein bei Verbrauchern kann jedoch durch anfängliche Kennzeichnung geschaffen werden. Die fehlende Kennzeichnung von genomeditierten Produkten führt zu einem widersprüchlichen Rechtsrahmen in der EU und erschwert die Identifizierung dieser Produkte. Zudem würden freiwillige Kennzeichnungen eine Unterscheidung der Produkte erschweren.

Inwieweit mit einer Zulassung von CRISPR/Cas zu rechnen ist werden folgende Ausführungen der Experten präsentieren.

Tabelle 17: Lebensmittelrecht - Zulassung

Zulassung
Eine Zulassung von genomeditierten Produkten ist aktuell schwierig und unrealistisch, hauptsächlich aufgrund von ideologischen Hürden. Eine Zulassung und Nutzung wären förderlich für die EU, da Bevölkerungswachstum und begrenzte landwirtschaftliche Flächen eine erhöhte Produktion erfordern. Die klassische Züchtung kann nicht schnell genug reagieren, um diesen Herausforderungen gerecht zu werden (Weinl, p. 17, Zeile 8-21).
Eine Mehrheit in Brüssel, die sich für ein Herabsetzen der Regulierungshöhe von Genome Edits einsetzt, kann prognostiziert werden. Die EU könnte den Mitgliedstaaten die Entscheidung überlassen, wie sie mit Genome Edits umgehen möchte, was jedoch zu fehlender Abstimmung und mangelnder Koordination sowie der Durchsetzung des Maximalstandards führen würde. Ein angemessener Gesetzesentwurf zur Regulierung würde auf dem Vorsorgeprinzip basieren. Die Gefahrenvorsorge muss jedoch abhängig von dem Risikopotenzial der jeweiligen Methode erfolgen. Dadurch könnten Zeit, Geld und Ressourcen effizient eingesetzt werden. (Weigel, p.15, Zeile 13-28).
Die Einführung von Safety Levels, wäre eine Möglichkeit über die (De)-Regulierung von Gentechnik zu unterscheiden. Safety Levels finden bereits Anwendung bei der Zulassung von gentechnischen Laboren. Das Prinzip der einmaligen Einstufung beruht darauf, welche Organismen als Promotoren und Rezeptoren fungieren. Im Fokus steht die Sequenz, die aus einem Gen entnommen wird, sowie der Organismus, in den sie eingefügt wird. Geprüft wird, inwieweit das entnommene Gen ein Pathogen für Pflanze oder Mensch darstellt. Darauf folgt die Einstufung in Safety Level 1-4. Es wird objektiv beurteilt, in

welchem Sicherheitsrahmen gearbeitet werden muss, um dem jeweiligen Gefahrenpotenzial gerecht zu werden (Kumlehn, p. 18, Zeile 28-33, p. 19, 4-7, 13-26).

Wie bereits bei der Thematik der Risiken angesprochen wurde existiert das Sortenschutzgesetz. Eine naheliegende Lösung könnte die Integration von genomeditierten Pflanzen in das bestehende Sortenschutzgesetz darstellen. Sofern die Industrie Genome Editing mit konventioneller Züchtung gleichstellt, dürften entsprechend genomeditierte Pflanzen keinen höheren Schutz erhalten (Weigel, p. 13, Zeile 8-14).

Alle Sorten, die für Anbau und Vertrieb zugelassen werden, müssen das Sortenzulassungsverfahren durchlaufen (Kumlehn, p. 15, Zeile 25-26, 28-29). Jede neue Sorte muss von Züchtungsfirmen mit Vorteilen gegenüber bestehenden Sorten gerechtfertigt werden. Für Genome Editing müsste das ebenso gelten und nachvollziehbar sein mit welchem Grund jeweiliges Gen verändert wird (Weigel, p. 12, Zeile 29-33).

Die Sortenzulassung könnte die systematische Abdeckung des Allergiepotentials mit aufnehmen. Bei genetischen Veränderungen besteht verallgemeinernd das Risiko allergische Reaktionen auszulösen, was bereits erwähnt wurde. Eine Überarbeitung der Sortenzulassung könnte genomeditierte Pflanzen einwandfrei integrieren (Kumlehn, p. 15, Zeile 22-35, p. 16, Zeile 1-7).

Die Einordnung genomeditierter Pflanzen zu der Kategorie Novel Food ist eine schlüssige Grundidee. Hierbei würde der Faktor des Allergiepotentials gut aufgenommen werden. Die Problematik bei neuen Sorten, die es nicht zur Anbauzulassung schaffen, liegt oft in der Identifikation sowie der Akkumulation toxischer Substanzen, die in vielen Fällen nicht relevant sind (Kumlehn, p. 16, Zeile 9-19).

Das Gentechnikgesetz soll besondere Gefahren zu genetisch verändertem Pflanzen reduzieren und/oder ausschließen. Es bewertet spezifische Risiken aus zu beurteilenden Organismen. Sollte für Genome Edits eine Grundbeurteilung gesetzlich vorgeschrieben werden, würde beleuchtet werden, inwieweit ein bestimmter Teil des veränderten Organismus Schaden anrichten kann. Ungeklärt bleibt, ob und wann eine Gesetzeserweiterung erfolgt. Werden eigene Lösungen angewendet oder wird das Verbot des Vertriebs genomeditierter Pflanzen für importierte Ware ausgenommen? (Kumlehn, p. 13, Zeile 24-28, p. 19, Zeile 30-35, p. 20, Zeile 1-2).

Key Message: Eine Zulassung von genomeditierten Produkten ist basierend auf der bestehenden Rechtslage in der EU unwahrscheinlich, obwohl sie in Anbetracht des Bevölkerungswachstums und begrenzter landwirtschaftlicher Flächen von großem Nutzen sein kann. Eine Mehrheit in Brüssel könnte für eine Lockerung der Genome-Editing-Regulierung eintreten. Die Einführung von Safety Levels könnte die Gentechnik-Regulierung beeinflussen. Die Integration von genomeditierten Pflanzen in das Sortenschutzgesetz und/oder der Einführung von Safety Levels wären mögliche Lösungsansätze. Die Sortenzulassung könnte das Allergiepotezial abdecken und die Einordnung von genomeditierten Pflanzen zu Novel Food ist sinnvoll. Das Gentechnikgesetz bewertet Risiken von veränderten Organismen, aber Fragen zur möglichen Erweiterung bleiben offen.

6. Diskussion

6.1. Methoden Diskussion

Die Anwendung der zwei Methoden hat zu einem umfangreichen Ergebnisteil geführt. Herausforderungen während der Literaturrecherche ergaben sich während der Suchstrategie, da durch den Einschluss zweier Lebensmittel, die Publikationszahlen trotz der Festlegung von Ein- und Ausschlusskriterien sehr hoch ausfielen. Trotzdem war es sinnvoll, die Publikationen länderspezifisch nicht einzugrenzen, da somit ein größtmöglicher Anwendungsbereich weltweit abgebildet werden konnte.

Was die Interviewmethode anbelangt konnten sehr bereichernde Schlussfolgerungen gezogen werden. Die Analyse der Daten gestaltete sich am herausforderndsten, da der Interviewleitfaden teilweise schwer einzuhalten war, sodass sich das Herausfiltern vergleichbarer Ergebnisse als zeitintensiv herausstellte.

Die Methode hat sich für ein Thema, das auf politischer, wissenschaftlicher, technologischer, wirtschaftlicher und gesellschaftlicher Ebene diskutiert wird, als nützliche Methode herausgestellt. Die Interviews können dazu beitragen, dass in den genannten Bereichen mehr Klarheit entsteht und vor allem in der breiten Bevölkerungsschicht bestehende Unsicherheiten reduziert werden. Es ist anzumerken, dass durch die qualitative Interviewform Gütekriterien, wie Validität und Reliabilität schwierig anzuwenden waren und die Qualität der Interviews uneindeutig bleibt. Da ausschließlich drei Interviews zustande kamen, ist der Stichprobenumfang sehr begrenzt und kann nicht auf die Grundgesamtheit und somit nicht auf Deutschland oder die EU übertragen werden.

6.2. Ergebnis Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Literaturrecherche zeigen, dass es gelungen ist, relevante Lösungsansätze für die Entwicklung stabiler Pflanzeigenschaften in Kulturpflanzen wie *S. tuberosum* und *S. lycopersicum* darzustellen. Der Hauptanwendungsbereich der CRISPR/Cas-Technologie in der Pflanzenzüchtung hat durch Genbearbeitung maßgeblich dazu beigetragen, vorteilhaftere Merkmale in pflanzlichen Organismen hervorzubringen. Es zeigte sich, dass die Adressierung von Genen, Eigenschaften in Kartoffeln und Tomaten verändern konnte. Es ist möglich gewesen einen umfassenden, wissenschaftlich fundierten und aktuellen Überblick über die Anwendung der Technologie und das zugehörige Forschungsfeld zu erarbeiten, sodass der erste Teil der Forschungsfrage beantwortet werden konnte. Die wesentlichen Ergebnisse aus der Literaturrecherche werden folgend zusammengefasst.

Solanum tuberosum

Für die Anwendungsbereiche der CRISPR/Cas-Technologie zur Bearbeitung unterschiedlicher Pflanzeigenschaften haben sich für Kartoffel sechs wesentliche Bereiche herauskristallisiert.

Hinsichtlich der Beeinflussung des Nährwertes mit CRISPR/Cas, konnten in Kartoffeln Mutationen erzeugt werden, die zu einer geringeren PPO-Aktivität führten. Eine Reduktion der enzymatischen Bräunung konnte festgestellt- und geschmackliche Beeinträchtigungen sowie Nährwertverlust verhindert werden.

Die Anwendung der CRISPR/Cas-Technologie trägt dazu bei, die Qualität von Kartoffeln wesentlich zu verbessern. Die Acrylamidproduktion, die durch CIS erhöht wird, kann reduziert werden. Kartoffelpflanzen werden vor CIS geschützt, indem entsprechende Gene, die die Invertase vorantreiben, gezielt gestört werden.

Zu der Veränderung der Pflanzenarchitektur bei Kartoffeln ist hauptsächlich das optische Erscheinungsbild zu nennen. Es werden Farbveränderungen für die verarbeitende Industrie durch die Beeinflussung von Genen, die den Carotinoidgehalt regulieren bewirkt.

CRISPR/Cas ist eine wirksame Methode, um die Bildung toxischer SGAs zu reduzieren und die Kartoffelprodukte sicherer und gesünder zu gestalten. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass induzierte Mutationen von Genen die α -Solanin-Produktion reduzieren können.

Weiter zeigen die Ergebnisse, dass CRISPR/Cas angewendet wird, um Sensitivitätsgene in Kartoffeln zu deaktivieren und dauerhafte Resistenzen gegen Krankheitserreger anzustreben. Das bietet eine verbesserte Pflanzengesundheit und -produktivität. Relevante Erreger stellen *P. infestans* und Potato Virus Y dar.

Die Forschungsergebnisse zeigen, dass mittels CRISPR/Cas die Stärkezusammensetzung sowie die Stärkeigenschaften von Kartoffeln für die Verwendung in der Lebensmittelindustrie gezielt verändert werden konnten. Die Amylose-Komponente der Stärke konnte entfernt werden. Das Viskositätsprofil der Knollenstärke wurde reguliert. Darüber hinaus konnten wachsartige- und texturgebende Kartoffelstärkeigenschaften hervorgebracht werden.

Solanum lycopersicum

Für die Anwendungsbereiche der CRISPR/Cas-Technologie zur Bearbeitung unterschiedlicher Pflanzeigenschaften haben sich für Tomaten ebenfalls sechs wesentliche Bereiche herausgestellt.

Bei *S. lycopersicum* werden durch CRISPR/Cas induzierte Mutationen, relevante Stoffwechselwegen verstärkt oder vermindert. Bei Tomaten kann dadurch über einen höheren Zuckergehalt und der vermehrten Anwesenheit von Carotinoiden ein gesteigertes Tomatenaroma erreicht werden. Es profitieren somit Farbe und Geschmack. Induzierte Anpassungen im GABA-Stoffwechsel sollen gesunde Inhaltsstoffe erhöhen. Ein verlangsamter Chlorophyllabbau steigert Carotinoide und Tocopherole.

CRISPR/Cas verbessert die Tomatenqualität. Die Studien zeigten, dass eine gesteigerte Haltbarkeit durch induzierte Genmutationen hervorgebracht werden konnte. Hierbei wurde bei Pektin-abbauenden Enzymen mit der CRISPR/Cas Methode angesetzt, um die Festigkeit und Haltbarkeit zu bestimmen, indem die Zellwandstruktur gefestigt wird.

CRISPR/Cas beeinflusst die Tomatenpflanzenarchitektur. Studien haben eine veränderte Fruchtform sowie unterschiedliche Farbausprägungen durch die Genmutationen mittels CRISPR/Cas erwirken können.

Die konventionelle Tomatenzucht strebt hohe Erträge an. Studien zeigen, dass sich die Fruchtreife mit CRISPR/Cas erfolgreich beeinflussen lässt. Im Detail wurde die Fruchtgröße deutlich erhöht. Zudem zeigten Genmutanten der CRISPR-Methode mehr Blüten und prolate Fruchtformen. Wildtomaten werden durch CRISPR/Cas mit gewünschten Eigenschaften kombiniert. Auch hier resultieren größere Früchte, eine gesteigerte Anzahl an Früchten, sowie eine Anreicherung von Nährstoffen wie Lycopin.

Tomatenpflanzen sind besonders anfällig für verschiedene Pflanzenkrankheiten wie Fusarium-Welke, Mehltau, Phytophthora infestans (Kraut- und Knollenfäule) und bakterielle Ringfäule. Resistenzen gegen diese Krankheiten sind von großer Bedeutung, um den Einsatz von Pestiziden zu reduzieren und die Ernteerträge zu sichern. Forschungen mit CRISPR/Cas haben gezeigt, dass gezielte Genmodifikationen eine Möglichkeit bieten, die Anfälligkeit der Tomatenpflanzen gegenüber diesen Krankheitserregern zu verringern. Die Interaktion zwischen den Krankheitserregern und den Pflanzen kann durch CRISPR/Cas zuverlässig unterbrochen werden. Es können widerstandsfähigere Tomatensorten

entwickelt werden, die eine bessere Abwehr gegenüber diesen spezifischen Krankheiten aufweisen.

Die Anpassung von Tomatensorten an unbeständige Umweltbedingungen, die durch Hitze, Kälte, Trockenheit und Salzstress hervorgerufen werden, eröffnen ein zusätzliches Anwendungsfeld für die CRISPR/Cas-Technologie. Häufig bestehen Wechselwirkungen zwischen diesen Eigenschaften, bei denen eine Eigenschaft von einer anderen beeinflusst oder bedingt wird.

Die Studien zeigen, dass der Forschungsstandort vorzugsweise im nicht-europäischem Ausland angesiedelt ist (Menz et al., 2020, p.2).

Für die Zusammenfassung der Interviewergebnisse kann sich an den im Ergebnisteil dargestellten Key-Messages orientiert werden, die bereits in dem Ergebniskapitel erforderlich wurden, um eine einheitliche Übersicht zwischen den Interviewthemen gewährleisten zu können. Diese Notwendigkeit bestand aufgrund der großen Datenmengen.

6.3. Interpretation der Ergebnisse

Bereits nach der Zusammenfassung der Ergebnisse wurde ersichtlich, welche züchterisch zugrundeliegenden Anwendungsbereiche mit der CRISPR/Cas Technologie bei *S. tuberosum* und *S. lycopersicum* aktuell abgedeckt werden. Damit konnte die Beantwortung der ersten Teilforschungsfrage erfolgreich über die Literaturrecherche erarbeitet werden. Nachfolgend werden die bearbeiteten Pflanzeigenschaften, die durch die Anwendung von CRISPR/Cas, ermöglicht wurde, miteinander ins Verhältnis gesetzt und diskutiert.

Literaturrecherche

Gemeinsame und unterschiedliche Eigenschaftsveränderungen mit CRISPR/Cas

Insgesamt haben sich Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den züchterisch zu verändernden Eigenschaften von *S. tuberosum* sowie *S. lycopersicum* ergeben.

Für die Anwendung von CRISPR/Cas bei Kartoffeln und Tomaten stellte sich heraus, dass sich das Forschungsinteresse in den meisten Fällen auf ähnliche Eigenschaften fokussierte. Gemeinsame Eigenschaften haben überwogen. Hierzu zählen:

- Verbesserung von Geschmackseigenschaften und Nährstoffgehalt
- Verbesserte Qualität und Haltbarkeit
- veränderte Pflanzenarchitektur
- verbesserte Pathogenresistenz

Wird ein Vergleich der eingeschlossenen Publikationen zu den Eigenschaften, die sowohl bei Kartoffel als auch bei Tomate relevant sind gestellt, wird ersichtlich zu welche der beiden landwirtschaftlichen Produkte ein zunehmend fortschrittlicher Forschungsstand der vorangestellten Eigenschaft existiert. Durch CRISPR/Cas veränderte Geschmackseigenschaften sowie einem veränderten Nährstoffgehalt wurden deutlich umfangreichere Ergebnisse bei Tomaten als bei Kartoffeln festgestellt. Das könnte sich dadurch begründen, dass Tomaten im LEH eine deutlich größere Variation an unterschiedlichen Sorten mit unterschiedlichen Geschmacksausprägungen als Kartoffeln aufweisen (Jürkenbeck et al., 2019, p. 328-329). Durch die größere Nachfrage an Geschmacksvariationen bei Tomaten könnte auch ein größeres Interesse daran bestehen mit CRISPR/Cas zeitsparendere Sorten hinsichtlich Geschmack und Nährwert zu produzieren. Kartoffeln werden weitaus weniger aufgrund geschmacklicher Eigenschaften erworben, weshalb der Anwendungsbereich von CRISPR/Cas bei Kartoffeln tendenziell auf der Modifikation von funktionellen Eigenschaften beruht (Tussipkan & Manabayeva, 2021, p. 2-3). Ob die Biosynthesewege für

Geschmacksstoffe und Nährstoffe in Tomaten einfacher mit CRISPR/Cas zu beeinflussen sind als in der Kartoffel müsste in weiteren Recherchen genauer betrachtet werden. Kartoffeln und Tomaten haben eine unterschiedliche Züchtungsgeschichte, was zu unterschiedlichen Reaktionen auf genetische Veränderungen führen könnte (Wünschiers, 2019, p. 60-67). Darüber hinaus ist es wichtig zu erwähnen, dass die Aktivität des CRISPR/Cas-Systems von Kartoffelsorte zu Kartoffelsorte unterschiedlich ausfallen kann. Die erfolgreiche Durchführung eines Experiments hängt demnach nicht nur von der Methode ab. Sie muss auf die Forschungsfrage und den Organismus angepasst werden. Anderenfalls ist es möglich, dass Studienziele nicht abgeschlossen werden können (González et al., 2020, p. 333ff).

Eine weitere gemeinsame Eigenschaft zu generierten Ergebnissen hinsichtlich der Anwendung von CRISPR/Cas bei Kartoffeln und Tomaten, ist die Verbesserung der Qualität und Haltbarkeit. In vorliegender Ergebnisdarstellung ist zu erkennen, dass bei Kartoffeln deutlich mehr Forschung betrieben wurde. Kartoffel und Tomate haben von ihren Qualitäts- und Haltbarkeitsanforderungen unterschiedliche Kriterien zu erfüllen und die Folgen bei nicht Einhaltung sind unterschiedlich gravierend einzustufen (Hou et al., 2023, p. 2-6). Es wäre möglich, dass der Forschungsschwerpunkt in der Vergangenheit vermehrt auf Publikationen zur Qualität und Lagerstabilität bei Kartoffeln als bei Tomaten lag. Bei der Kartoffel handelt es sich um ein Grundnahrungsmittel, weshalb es möglich wäre, dass eine gleichbleibende Qualität sowie eine zuverlässige Lagerstabilität als relevanter eingestuft werden (B. Liu et al., 2021, p. 570-577) als die Haltbarkeit einer Tomate, die im schlimmsten Fall zwei Tage früher ihre Festigkeit durch den Pektin Abbau verliert (D. Wang et al., 2019, p.544). Zudem können Landwirt:Innen ein verstärktes Interesse an der Notwendigkeit von verbesserten Pflanzeigenschaften von landwirtschaftlichen Produkten äußern, zu denen Forschung erforderlich ist. Somit können Fördermittel und Forschungsressourcen ebenfalls zu einer ungleichen Verteilung der Forschungsergebnisse geführt haben (Voigt, 2023 p.5787-5803).

Weiter ist die Bearbeitung der Pflanzenarchitektur sowohl von Kartoffeln und Tomaten zu gleichen Teilen relevant, wobei weitaus mehr Merkmalsausprägungen bei Tomaten als bei Kartoffeln durch CRISPR/Cas gezeigt wurden. Dies könnte daran liegen, dass Kartoffeln durch ein unterirdisches Wachstum charakterisiert sind und Tomaten unmittelbar in Trauben an den Stängeln reifen, die vom Hauptstamm abgehen. Je nach Sorte variiert die Anordnung. Somit ist der Ertrag und die Ausbildung der Frucht maßgeblich von der Struktur des Pflanzengerüsts abhängig (Guo et al., 2022, p.11-12). Das könnte die vorliegende Studienlage hinsichtlich Pflanzenarchitektur begründen.

Wird sich der Pathogenresistenz gegenüber Schadorganismen gewidmet ist zu erkennen, dass deren Beeinflussung mittels CRISPR/Cas mit am bedeutendsten ist. Dies äußert sich sowohl bei Kartoffeln als auch bei Tomaten in vielen vorgestellten Publikationen bei denen unterschiedliche Genbearbeitungen durchgeführt wurden.

Die Publikationszahl zur Pathogenresistenz von Tomaten übertrafen dennoch die der Kartoffel. Generell konnte festgestellt werden, dass die am häufigsten auftretenden Pathogene sowohl Kartoffel als auch Tomate befallen. Hierzu gehören *P. infestans*, Potyviren, wie das PVY und PepMoV sowie das Mehltaupathogen. Aus den pflanzenübergreifenden Pathogenen wird die Notwendigkeit verdeutlicht artübergreifende Pathogene noch intensiver zu erforschen. Für Tomaten ergeben sich eine Reihe weiterer Studienergebnisse zu Pathogenresistenzen. Generell zeigen die Publikationen, die Bedeutung der Pathogenresistenz auch im Hinblick auf andere Pflanzenarten. Gerade bei Raw-Crops, wie Weizen, Gerste oder Mais ist die Anwendung von CRISPR/Cas hinsichtlich der Abwehr von Pathogenen sehr aktuell und weit fortgeschritten (Wani et al., 2022, p.5787-5803). Die Erkenntnisse zu der möglichen Entwicklung von pathogenresistenten Sorten sollte in der Landwirtschaft ein großes Anwendungsgebiet decken können, um Ertragssicherheit sowohl in Gewächshäusern als auch auf Äckern zu gewährleisten (Ito et al., 2015 p.76-82). Hierbei wäre es möglich hinsichtlich einiger komplexer Zusammenhänge zwischen der Pathogenresistenz, Genetik sowie Umweltfaktoren und auch unterschiedlichen Anbauverfahren ein für die Landwirtschaft praktikables und nachhaltigeres Konzept zu erstellen, indem die Anwendung von CRISPR/Cas integriert werden würde (Clemens, 2021, p.341-344).

Die vorliegende Forschung hat ergeben, dass sich jeweils für *S. tuberosum* und für *S. lycopersicum* zwei relevante Pflanzeigenschaften ergeben haben, die jeweils bei der anderen Pflanze gemäß diesen Untersuchungsergebnissen kaum oder nicht relevant gewesen sind.

Bei *S. tuberosum* spielen folgende Eigenschaften eine produktspezifische Rolle:

- Reduktion toxischer Substanzen
- Verbesserten Stärkezusammensetzung

Bei *S. lycopersicum* sind es hingegen nachfolgende Eigenschaften bedeutend:

- Effektive Fruchtreife
- Abiotische Belastung

Bei der Kartoffel spielt besonders die Reduktion toxischer Substanzen, wie Solanin oder toxische SGAs eine Rolle. In Tomaten ist die Anreicherung toxischer Stoffe ebenfalls möglich allerdings in einem noch geringeren Ausmaß als in der Kartoffel. Es lässt sich die Vermutung anstellen, dass die Forschungslage aus diesem Grund weniger ausgeprägt ist als bei Kartoffeln. Zudem ist anzumerken, dass toxische Stoffe, wie Solanin und Chaconin in Tomaten ausschließlich in unreifen grünen Tomaten sowie den nicht zu verzehrenden Pflanzenbestandteilen angereichert werden, weshalb deren Reduktion primär nicht notwendig ist und grundsätzlich in ungefährlichen Mengen auftreten (Föllner & Stangl, 2021, p.333). Des Weiteren hat die Kartoffel für die Stärkeverarbeitende Industrie eine entscheidende Schlüsselrolle, weshalb die Anwendung von CRISPR/Cas für das Beeinflussen verschiedener Stärkeeigenschaften einen zentralen und wirtschaftlich wertvollen Ansatzpunkt darstellt. Tomaten besitzt keine Stärkekomponente, weshalb die Nutzung des CRISPR/Cas-Systems in diesem Bereich keine Anwendung findet.

Bei Tomaten waren hingegen Studien zu effektiveren Fruchtreife auffallend stark vertreten, wohingegen eine verbesserte Fruchtreife bei Kartoffeln in vorliegenden Ergebnissen keine exemplarisch und aufschlussreichen Ergebnisse lieferte. Kartoffeln sind ebenso wie Tomaten auf stabile und ertragreiche Ernten fokussiert. Es müssten weitere Forschungen angestellt werden, um möglich Ursache zu finden. Mögliche Ansätze wären die Pflanzenbiologie und -Physiologie beider Nachtschattengewächse zu untersuchen. Es könnte herausgefunden werden, ob funktionelle Gene für eine effektivere Fruchtreife bei Kartoffel wenig bekannt sind und zum Beispiel noch am Anfang der Grundlagenforschung stehen. Dazu könnte eine neue Teilforschungsfrage formuliert werden.

Zudem wurden viele Studien zu der Anwendung von CRISPR/Cas bei Tomaten zu der Veränderung von Pflanzeigenschaften hinsichtlich Abiotischer Belastungen wahrgenommen, wohingegen, aussagekräftige Studien zu diesem Thema bei Kartoffeln ausblieben.

Es wurde vermutet, dass hinsichtlich der abiotischen Belastungen bei Kartoffeln ebenfalls einige Publikationen hinsichtlich einer Anwendung von CRISPR/Cas hätten identifiziert werden können. Kartoffeln sind besonders der Salzbelastung von Böden ausgesetzt. Für Tomaten ergaben sich viele Studien zu salztoleranteren Pflanzen. Eine eingeschränktere

Datenlage zu der Anwendung von CRISPR/Cas bei Kartoffeln zur gezielten Toleranz gegenüber Abiotischen Belastungen bleibt offen.

Generell gestaltet sich die eindeutige und exakte Einteilung der Studienergebnisse für die relevanten Eigenschaften von Kartoffel und Tomate vereinzelt als herausfordernd aufgrund von Überschneidungen und eigenschaftsübergreifenden Abhängigkeiten. Das demonstriert zum Beispiel die Beziehung zwischen Pflanzenarchitektur, Frucht reife und Geschmack bei Tomaten. Eine veränderte Pflanzenarchitektur induziert eine verbesserte Frucht reife, die durch unterschiedlich beeinflusste Fruchtformen resultiert. Zugleich gehört die Frucht farbe zur Pflanzenarchitektur. Die wiederum wird durch die Regulierung unterschiedlicher Carotinoide beeinflusst. Carotinoide können neben ihrer farbgebenden Eigenschaft für die Beeinflussung von Geschmackskomponenten sorgen (Jäkel, 2021, p. 246).

Zusammenfassen geht die Eigenschaft der Pathogenresistenz am bedeutendsten aus der Diskussion der Literaturrecherche hervor.

Für Deutschland wären hinsichtlich pathogenresistenter Pflanzen ackerbauliche Kulturen sinnvoll mit CRISPR/Cas einsetzbar. Darunter fallen Weizen, Mais und Raps. Tomaten werden ebenfalls ein Potenzial zugesprochen (Feldmann et al., 2023, p. 15).

In den Studien und im weiteren Verlauf der Interview-Diskussion, wird ersichtlich, dass sofern für Pathogenresistenzen sogenannte Suszeptibilitätsgene verwendet werden, eine dauerhafte Resistenz herbeigeführt werden kann. Hier ist zu beachten, dass es bei einigen Kulturpflanzen an einem methodischen Zugang scheitert. Dabei fehlt häufig eine hinreichende Sequenzierungsinformation. Grundsätzlich ist es bei züchterischen Modifikationen der Fall, dass die S-Gene bei jeder Kulturpflanze immer auch andere quantitative Eigenschaften, wie Ertrag oder Pflanzenarchitektur stören können. Dabei stehen die qualitativen und quantitativen Merkmale in einem prozentualen Verhältnis. Aus diesem Grund ist zu erwähnen, dass im Vorfeld jedes der Sensitivitätsgene umfangreich analysiert werden muss, damit die Technologie real einen Mehrwert im Gegensatz zur konventionellen Züchtung bringt, bei der negative Eigenschaften aktiv herausgekreuzt werden müssen.

Zudem ist das im Jahre 2020 in Deutschland ins Leben gerufene Forschungskonsortium (PILTON) zu erwähnen, wobei sich zahlreiche Züchter beteiligen und Winter- und Sommerweizen mit entsprechenden Pilzresistenzen ausstatten (Wilhelm et al., 2022, p.42). Auch hier wird die Bandbreite an Produkten aus landwirtschaftlicher Erzeugung, bei der CRISPR/Cas eine Anwendung spielen kann deutlich.

Experteninterviews

Durch die folgende Interpretation der Ergebnisse der Experteninterviews konnte der zweite Teil der Forschungsfrage beantwortet werden und somit festgestellt werden, wie der gegenwärtige Status der Technologie ausfällt und welche Bedeutung sie für landwirtschaftliche Nutzpflanzen und Obstkulturen zukünftig einnehmen wird.

Als erstes werden die unterschiedlich existierenden Arten von CRISPR/Cas Genome Edits näher betrachtet. Wie Dr. Weigel bereits erwähnte existieren drei unterschiedliche Arten von Genome Edits hinsichtlich der CRISPR/Cas-Technologie. Die Unterscheidung ist wichtig, um deren Verwendung in der Pflanzenzucht auf wissenschaftlicher Ebene differenziert diskutieren zu können. SDN-1, SDN-2 und SDN-3 bieten durch ihre unterschiedliche Herangehensweise, um den Doppelstrang der Pflanzen-DNA zu reparieren Diskussionsbedarf. Die SDN-3 Reparatur, ähnelt, wie von Dr. Weigel bestätigt, der klassischen Transgenese, da dem zelleigenem Reparatursystem sehr lange Abschnitte und vollständige Gene für das Einfügen in die Pflanzen-DNA zur Verfügung gestellt werden. Nach dem durch das Cas-Protein erzeugten Doppelstrangbruch der DNA werden diese großen Genabschnitte zwischen den beiden Enden hineinkopiert. Die an dieser Stelle zu beachtende Abgrenzung zur Transgenese besteht in dem Vorteil, dass die Erbsequenz an einer vorher festgelegten Stelle integriert werden kann. Mit SDN-3 wäre es zudem möglich Cisgenese zu betreiben. In der aktuellen und praxisnahen Anwendung von CRISPR/Cas werden allerdings zu 95% SDN1-Verfahren verwendet, bei denen das zelleigene Reparatursystem keine vom CRISPR/Cas-System mit integrierten Vorlagen verwendet, um kleine oder große DNA-Abschnitte zu verbauen. In diesem Fall handelt es sich um kein Transgenese ähnliches Werkzeug. Es erfolgt eine zufällige Mutation, was beweist und Aufschluss darüber gibt, dass die SDN1-Methode gleichwertige Mutationen, wie sie in der Natur vorkommen, hervorbringt. Alles in allem ist die Verfahrensentwicklung noch nicht annähernd ausgeschöpft oder abgeschlossen und es werden laufend verschiedene Verbesserungs- und Optimierungsmöglichkeiten durch Studien veröffentlicht (Wilhelm et al., 2022, p. 15)

Die Interviews bezogen sich ebenfalls zu einem Teil auf die Veränderung von Kartoffeln und Tomaten durch CRISPR/Cas. Dr. Kumlehn bestätigte durch vielseitige Blickwinkel die Bedeutung der Pathogenresistenz insbesondere von *P. infestans* bei Kartoffeln, die bereits in der vorangestellten Literatur-Diskussion zur Geltung kam. Klimatische Eingriffe seitens des Menschen sind zu verringern, indem Pflanzen gegenüber zukünftig auftretenden Pathogenen resistent sind und weniger gespritzt werden müssen (Kumlehn, p. 7, Zeile 9-14). Diese Tatsache bestätigen zahlreiche bereits vorgestellte Studien, wie (Kieu et al., 2021, p. 3-4), (Razzaq et al., 2022, p. 3-9) oder (Lucioli et al., 2022, p. 1, 4).

Dabei nahm Dr. Kumlehn neben der Kartoffel auf weitere landwirtschaftliche Produkte Bezug, die in Kanada und den USA bereits implementiert sind und durch Genome Editing hergestellt werden. Dazu gehört der CIBUS-Raps, der zum einen durch ungerichtete, verstärkt induzierte Mutagenese mit Chemikalien und Strahlung, was weitgehend akzeptiert wird, hergestellt wurde. Zum anderen hat es eine Anwendung mit TALENS gegeben. Diese CIBUS-Raps-Sorte enthielt eine Herbizidresistenz (Kempken, 2020, p. 131-145) und hat für viel Diskussionspotenzial gesorgt (Kumlehn, p. 3, Zeile 8-15).

Neben der Pathogenresistenz von Kartoffeln und dem Vergleich zu weiteren relevanten Lebensmitteln, wurde in den Interviews deutlich, dass die Kartoffel einen primären Nutzen in der stofflichen Produktion als Industriekartoffel haben wird. Die Produktion von Stärke mit differenzierten Eigenschaften sehen Dr. Weinl und Dr. Weigel als sehr wahrscheinlich an, bevor es in den Bereich der direkten Ernährung gehen wird. Diese Einschätzung ist aus den Studien nicht eindeutig hervorgegangen. Die Studien haben sich in der Regel auf eine gezielte Fragestellung konzentriert. Entweder auf die Stärkezusammensetzung oder zum Beispiel auf die Reduktion toxischer Stoffe. Eine anwendungsübergreifende Einschätzung, wie die der Experten konnte innerhalb einer einzelnen Studie nicht geleistet werden, weshalb die Methodenkombination aus Literaturrecherche und Interviews abermals einen Vorteil darstellt.

Ebenfalls ist die Solanin Produktion von Kartoffeln während der Interviews angesprochen worden. Im Allgemeinen wurde diese jedoch als wenig gefährlich eingestuft. Die Reduktion toxischer Inhaltsstoffe konnte in den Studien wiederholt identifiziert werden. Gerade Themen, wie eine verminderten Solanin Produktion in Kartoffel, sind vermehrt behandelt worden. Neben der Reduktion toxischer Inhaltsstoffe in Kartoffeln sind weitere Produkte relevant, wie zum Beispiel *Camelina*, was Dr. Kumlehn erwähnte (Kumlehn, p. 9, Zeile 20-28). In *Camelina sativa* wurde verhindert, dass Glucosinolate bis in den Samen transportiert werden und dort akkumulieren. Dafür haben Transportmoleküle die Glucosinolate innerhalb der Pflanze aufwärts transportiert und ausgeschaltet. Das Öl des Samens ist somit frei von Giftstoffen, besitzt ein wertvolles FS-Profil sowie eine höhere Qualität. Gleichzeitig enthält die Pflanze weiterhin Abwehrstoffe. *C. sativa* wird hinsichtlich einer nachhaltigen Anbauweise eine zunehmende Rolle auch hinsichtlich der Erderwärmung spielen, da sie auf Standorten einen guten Ertrag bringt, wo Raps sich bereits unwohl fühlt (Hölzl et al., 2023, p. 189-194).

Die Anwendung von CRISPR/Cas bei Tomate hat ebenfalls einen Anteil der Interviews eingenommen. Auch hier können Parallelen zum Literaturteil gezogen werden.

Sowohl in Literatur als auch in den Interviews wird deutlich, dass sich die Tomate primär dazu eignet, inhaltsstofflich verändert zu werden. Dr. Weigel bestätigt die Tatsache, dass Eigenschaften in Prozentbereichen verändert werden, sodass für ein qualitatives Merkmal, wie für einen gesundheitsfördernden Stoff mit zum Beispiel 2-3% weniger Ertrag gerechnet werden muss. Durch das zunehmende Ziel verstärkt qualitative Merkmale in der Züchtung zu thematisieren ist ein Umdenken in der Pflanzenzüchtung verstärkt zu beobachten, da in den Anfängen der Züchtung hauptsächlich quantitative Eigenschaften, wie Ertrag als Maßstab galten (Wüschiers, 2019, p. 267ff). Eine konkrete Überschneidung zwischen Interviews und Literatur bot die gezielte Anwendung bekannte Allele aus der kommerziellen Anwendung in Wildtomaten zu modifizieren. Dabei wurde die Domestizierung der Tomate ohne weiteren Schritt mit CRISPR/Cas möglich. Auf die bereits vorgestellte Studie von (Zsögön et al., 2018) hat sich Dr. Weinl explizit bezogen. Dr. Weinl ist Mitglied des Forschungsteams von Zsögön et al. und war aufgrund dessen in der Lage aus erster Hand den Erfolg der Multiplex Anwendung, die unter anderem Größe und Nährstoffgehalt der Tomate steigerte, vorzustellen. Hier konnten somit auch inhaltsstoffliche Merkmale adressiert werden, die bei der Anwendung von CRISPR/Cas für Tomate mit am prädestiniertesten ausfielen. Die Bedeutung von Inhaltsstoffen bei der Anwendung von CRISPR/Cas hinsichtlich Tomaten kann ebenfalls an der kommerziell vertriebenen GABA-Tomate vorgestellt werden, dessen Inhaltstoff, die Gamma-Aminobuttersäure, verfünffacht wurde. Aus den Experteninterviews geht hervor, dass die positive Wirkung wissenschaftlich nicht eindeutig einzustufen ist. Für Dr. Kumlehn stellt die GABA-Tomate keine revolutionäre Lösung für globale Fragestellungen dar. An dieser Stelle kann laut Literatur und Experteninterviews ausschließlich festgehalten werden, dass die Beeinflussung des Stoffwechsels von GABA durch CRISPR/Cas stattfand. Für die eindeutige Bestätigung der Wirkung sollten Weiterführende Forschungen angestellt werden (Flemmer, 2011, p. 54).

Die Kombination der Literaturrecherche mit den Ergebnissen aus den Experteninterviews legen nahe, dass die Anwendung von CRISPR/Cas zur Modifikation von Pflanzeigenschaften auch über die Artgrenzen von *Solanaceae*n hinaus reicht.

Wie der Literatur zu entnehmen ist wird ebenfalls Salat- und Kohlanbau wichtig werden. Hier existiert eine große Vielfalt (Damerum et al., 2020, p. 161). Besonders bei Kohl könnten gesundheitsfördernde Inhaltsstoffe mit CRISPR/Cas exprimiert werden (Li et al., 2022, p. 151-154). Dr. Weigel betont, dass sich bei Salat ein erheblicher Vorteil ergeben würde, wenn weniger Pflanzenschutzmittel ausgebracht werden könnte. Diesen Vorteil direkt in der Werbung adressieren zu dürfen, dass dies durch Genom-Editierung ermöglicht wurde, könnte zu mehr Offenheit gegenüber der Technologie führen. Es wäre von Vorteil, wenn

die Bio-Landwirtschaft die Möglichkeit in Betracht ziehen würde, sich der Genom-Editierung anzunähern und ebenfalls zu nutzen (Weigel, p. 9, Zeile 18-27). Zu den von Dr. Weigel bereits angesprochenen Health Claims, ist hinzuzufügen, dass deren Zulassen in vielen Ländern streng geregelt ist (*Health Claims | EFSA, 2023*). Auch in anderen Bereichen haben Unternehmen versucht einen Zusammenhang zwischen einer von ihnen hergestellten Lebensmittelkomponenten mit einer gesundheitsfördernden Eigenschaft evidenzbasiert zu erarbeiten (Barry Callebaut). Das Verfahren kann sich als langwierig gestalten.

Generell liegt das Potenzial der Anwendung von CRISPR/Cas in den landwirtschaftlich genutzten Hauptpflanzensorten. Vor allem ist die EU ein großer Getreideerzeuger (BLE, 2023), weshalb alle Getreidesorten für eine Anwendung im Fokus stehen. Besonders Soja als Tierfutter (Wünschiers, 2019, p. 60) oder für den Direktkonsum wären relevant, sowie die technische Nutzung von Mais (Hermeling et al., 2023, p. 31ff). Dr. Weinl bezieht sich in diesem Zusammenhang auf den vermehrten Einsatz von Mais in Biogasanlagen. Könnte der Stoffwechsel des Mais verändert werden, sodass die Energiedichte maximiert würde, ergebe das eine solide Anwendung von CRISPR/Cas zu einer produktiveren Herstellung von Biogas (Weinl, p. 9, Zeile 23-31).

Um die zukünftige Bedeutung der CRISPR/Cas-Technologie darstellen zu können ist die Diskussion hinsichtlich von Aspekten, die Lebensmittelsicherheit betreffen erforderlich. Dr. Weinl erwähnt, dass die CRISPR/Cas-Technologie und andere Methoden zur Genom-Editierung keine größeren Risiken bergen als die bereits existierenden Züchtungsmethoden. Sie könnten somit als gleichwertig zu den bisherigen Züchtungsverfahren betrachtet werden. Diese Aussage deckt sich mit den bestehenden Leitliniendokumenten für die Bewertung der Genom-Editierung bei Pflanzen, die von der EFSA im Jahr 2020 veröffentlicht wurden (*Applicability of the EFSA Opinion on Site-directed Nucleases Type 3 for the Safety Assessment of Plants Developed Using Site-directed Nucleases Type 1 and 2 and Oligonucleotide-directed Mutagenesis | EFSA, 2020*).

Die Interviewergebnisse stellen dar, dass eine Risikoprüfung von landwirtschaftlichen Produkten, die mit CRISPR/Cas erzeugt wurden, auf dem Grundverständnis der Wissenschaft, nicht zwangsläufig erfolgen müsste. Auf rechtlicher Ebene wäre das jeweilige Zulassungsverfahren der Sorte imstande die Abschätzung potenzieller Risiken mit abzudecken (Weinl, p. 14, Zeile 4-11). Auch Dr. Kumlehn betont, dass für Pflanzen die Sortenzulassung existiert. Es sei sinnvoll, wenn genomeditierte Produkte, in die Sortenzulassung mit aufgenommen würden. Der Ausbau der Sortenzulassung führe zu einer praktikablen Lösung im Umgang mit Genome Edits (Kumlehn, p. 17, Zeile 18-19). Die EFSA spricht sich hinsichtlich

der Risikobewertung von genomeditierter Pflanzen dafür aus, dass alle drei Techniken (SDN-1, SDN2 und SDN-3) über die bestehenden Leitliniendokumente für die Risikobewertung gentechnisch veränderter Pflanzen bewertet werden sollen (*Bestehende Leitliniendokumente für die Bewertung der Genomeditierung bei Pflanzen* | EFSA, 2020). Das schließt die allgemeinen Schritte: Gefahrenidentifikation, Gefahrencharakterisierung, Expositionsabschätzung und Risikocharakterisierung ein.

Zu expliziten Risiken konnte während der Interviews über off-target Mutationen gesprochen werden. Das Risiko sollte ins Verhältnis zu bestehenden Züchtungstechniken gesetzt werden. Die Interviewten benennen, dass das Auftreten von off-targets, hauptsächlich in den anfänglich entwickelten CRISPR/Cas Systemen problematisch war. Das Risikopotenzial, dass durch ein fehlerhaftes Schneiden durch den CRISPR/Cas-Komplex eine nicht beabsichtigte Mutation auftritt wird als allgemein gering eingestuft. Dennoch kann dieser Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Experten verwiesen auf weiter entwickelte Technologien, wie Prime Editing, die fortlaufend an Sicherheit gewinnen (Weinl, p. 13, Zeile 15-31), (Weigel, p. 12, Zeile 12-22). Auch in der Literatur wird das mögliche Auftreten von off-target-Effekten erwähnt. Würde man das Risiko für off-target Effekte zwischen der Mutationszüchtung und Genome Editing miteinander vergleichen, wird ersichtlich, dass das Risiko bei CRISPR/Cas sehr viel geringer ausfällt, als bei der zugelassenen und jahrelang angewendeten Mutationszüchtung, bei der es, wie im Theorieteil erwähnt, zu willkürlichen und ungezielten Mutationen durch die Bestrahlung kommen kann (Heberer, 2021, p.13). Um einen off-target Effekt vorzubeugen ist eine sorgfältige Auswahl der gRNAs erforderlich. Hierfür existieren je nach Anwendungsbereich unterschiedliche Methoden sowie Tools, die bereits in den vorgestellten Studien der Literaturrecherche angesprochen wurden. Darüber hinaus ist es möglich mit bioinformatischen Ansätzen einige der potenziellen off-target Regionen im Vorfeld zu identifizieren und solche ähnlichen Standorte im Genome von vornherein zu vermeiden (Manghwar et al., 2020). Für zukünftige Forschungen wäre es möglich gezielte Methoden für die Entfernung solcher off-targets zu entwickeln. Andererseits würde ein weiterer Anweisungsschritt entstehen, der den Vorteil einer anwendungsfreundlichen und schnell durchführbaren Methode beschattet.

Weiter erklärt die Literatur, dass ein off-target Effekt mit demselben Unterschied zwischen zweier Pflanzen der gleichen Sorte erklärt werden könnte, was wiederum zu der Erkenntnis führt, dass die Mutation mit einer natürlichen Mutation, verglichen werden kann. Es ist festzuhalten, dass jede einzelne Pflanze, auch innerhalb derselben Sorte, sich aufgrund von natürlichen Mutationen sowohl auf dem Acker als auch im Feld oder im Gewächshaus natürlich voneinander unterscheidet. Ein auftretender off-target Effekt kommt einer natürlichen Reproduktion oder Vererbung sehr nah (Fehse, 2018, p. 223, 225, 227).

Aus den Interviews ging ebenfalls hervor, dass die Diskussion um Themen der Genome Editing Verfahren in der breiten Bevölkerung nicht stark der Wissenschaft zugewendet ist (Kumlehn, p. 6, Zeile 8-12). Aus der aktuellen Berichterstattung geht ebenfalls hervor, dass sich Bevölkerungsteile, die sich grundsätzlich auf die Seite der Gentechnikgegner gestellt haben, unabhängig von jeder Anstrengung an Aufklärungsarbeit, sich nicht von dynamisch und neu entwickelten Techniken überzeugen lassen würden. Seit den Anfängen von gentechnischen Werkzeugen ist es fraglich, wie eine ausgewogene Diskussion in der Wissenschaftsgemeinschaft sowie in der Gesellschaft stattfinden soll. Die Spaltung der Bevölkerung die kategorisch für oder gegen Gentechnik ist tragen maßgeblich zu der kontroversen und unpräzisen Situation bei (Gelinsky & Hilbeck, 2018). Dr. Kumlehn erwähnt zudem, dass öffentlichkeitsstrategisch falsche Weichen gestellt wurden, da der CIBUS- Raps als erstes landwirtschaftliche Produkt mit Genom-Editierung hergestellt wurde und das Thema der grundsätzlich negativ belegten Herbizidresistenzen aufkommen ließ. Es wäre sinnvoller gewesen mit einem anderen Thema hinsichtlich Genom-Editierung an die Bevölkerung heranzutreten (Kumlehn, p.4, Zeile 4-18).

Unvorteilhaft ist darüber hinaus die uneindeutige Regulierung, die ein anwendungsbezogenes Forschungs- und Nutzungsverbot in der EU vorgibt. Dr. Weigel betont eindeutig, dass gesellschaftlicher Konsense gefunden werden sollte, und Europa entscheiden muss, ob es CRISPR/Cas als funktionierendes Werkzeug einsetzen möchte (Weigel, p. 3, Zeile 18-20).

Während der Interviews wurde zudem das Ziel verfolgt die rechtliche Situation in Europa in Bezug auf CRISPR/Cas darzustellen. Hierbei verwiesen die Experten auf deutlich geringere bis nicht vorhandene Regulierung von genomeditierten Produkten außerhalb der EU. Dr. Weigel berief sich auf Länder wie Nordamerika, Kanada, China und Japan, die der EU gegenüber einen technischen Vorteil besitzen. Er erklärt, dass China im Stande ist durch CRISPR/Cas in Bioqualität zu produzieren (Weigel, p. 6, Zeile 31-34, p. 7, Zeile 1-2). Die detaillierte Rechtslage in anderen Ländern außerhalb der EU konnte von (Voigt, 2023, p.423) skizziert werden. Diese Quellen boten Aufschluss über weniger stark regulierte genomeditierte Produkte.

Die Ausgangssituation der Diskussion über die Einteilung genomeditierter Produkte in der EU beruht auf dem Urteil, das 2018 entschieden wurde und sich auf die Gleichstellung von genomeditierten Pflanzen mit gentechnisch veränderten Organismen bezieht (Gelinsky & Hilbeck, 2018, p.2-9). Genomeditierte Produkte werden somit rechtlich gesehen durch Verfahren, wie der Transgenese erklärt. Da die Methode der Transgenese nicht auf die CRISPR/Cas-Technologie zutrifft, ist diese rechtliche Einordnung für

wissenschaftsbezogene Zwecke unglücklich zu bewerten. Dr. Weigel verdeutlicht, dass die Anforderungen an einen neuen Gesetzesentwurf an die EU seitens der Forschung gestellt wurden und bereits Kräfte mobilisiert wurden, um langfristig eine De-Regulierung erwirken zu können. Eine schlüssige Rechtfertigung der derzeitigen Regulierung existiert nicht. Hierbei prognostiziert er, dass sich eine Mehrheit in Brüssel gegebenenfalls finden könnte, die Länder jedoch eigenständig über die Nutzung der Technologie entscheiden könnten, was vermutlich eine weitere Unklarheit herbeiführen wird (Weigel, p.15, Zeile 13-28).

Insgesamt ist die rechtliche Situation der Genom-Editierung in Europa vielschichtig. Nicht zuletzt durch die jahrelange Rechtsunsicherheit, die fehlende Unterscheidung der drei Verfahren SDN-1, SDN-2 und SDN-3 sowie der Diskussion über eine Kennzeichnungspflicht. Genomeditierte Produkte können in der EU bisher nicht identifiziert werden, da keine geeigneten Nachweisverfahren existieren. Ein weiterer Widerspruch zu der Rechtslage besteht einerseits durch das Verbot des Vertriebs und andererseits hinsichtlich einer geeigneten Einfuhrkontrollen von genomeditierten Produkten. Ein Nachweis von editierten Produkten ist derzeit nicht umsetzbar („ZEuS Zeitschrift für Europarechtliche Studien“, 2023). Diese Tatsache bestätigt Dr. Kumlehn sowie Dr. Weigel ebenfalls. (Kumlehn, p.12, Zeile 27-34, p. 13, Zeile 1-13, 19-24), (Weigel, p. 7, Zeile 2-5).

In Anbetracht der diskutierten Teilthemen wurde der aktuelle Stand und die zukünftige Bedeutung von der Anwendung von CRISPR/Cas aus unterschiedlichen Blickwinkeln beleuchtet. Hinsichtlich der Freisetzung von GVOs ist eine Auswirkung auf Natur und beteiligte Ökosysteme dennoch ein zu beachtender Faktor. Vor einer Freisetzung ist es sinnvoll unterschiedliche Fachkreise miteinzubeziehen. Für CRISPR/Cas könnten das Bereiche wie Ökologie, Molekularbiologie, Zoologie, Ethik sowie Agrarwissenschaften sein. Des Weiteren ist es wichtig die Öffentlichkeit miteinzubeziehen und den Entwicklungsprozess transparent darzustellen. In Deutschland ist dafür die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) zuständig. Bei jeder potenziellen Freisetzung von GVOs wäre eine Einzelbetrachtung erforderlich. Dabei sollte zwischen der Freisetzung genetischer Organismen sowie dem Inverkehrbringen unterschieden werden. Die Freisetzung ist durch die EU-Richtlinie 2001/18EG festgelegt. Für Deutschland ist diese Richtlinie in das nationale Gentechnikgesetz überführt worden (Kurreck & Beck, 2019, p. 83-89).

6.4. Empfehlungen

Basierend auf den Ergebnissen der Experteninterviews und dessen Interpretation lassen sich folgende Handlungsempfehlungen aussprechen:

- 1. Pflanzen, die durch CRISPR/Cas hergestellt werden, sollten mit konventionell gezüchteten Pflanzen gleichgestellt sein und somit von der Gentechnik-Regulierung befreit werden.**
- 2. Für die Zulassung von landwirtschaftlichen Produkten, die durch CRISPR/Cas hergestellt werden, sollten die Zulassungsverfahren des bestehenden Sortenschutzes in Betracht gezogen werden.**
- 3. Inwieweit eine Kennzeichnung von genomeditierten Produkten umgesetzt werden kann, sollte aufgrund vieler Unklarheiten hinsichtlich Einfuhr und Nachweis von Genome Edits weiter untersucht werden.**
- 4. Die Einbeziehung von Fachwissen durch Experten wäre für den Zulassungsprozess zielführend. Hierbei wären Fachbereiche aus Lebensmittelsicherheit, Genetik und Agrarwissenschaften sinnvoll.**
- 5. Eine transparente Kommunikation seitens der EU sollte an die Öffentlichkeit hinsichtlich CRISPR/Cas vermehrt bereitgestellt werden. Der Informationsaustausch zwischen Parteien und Akteuren aus der Landwirtschaft, Verbraucher:Innen sowie der Politik könnte Missverständnissen vorbeugen und ein verstärktes Vertrauen in die Technologie generieren.**

Zur genaueren Erläuterung von Punkt eins ist mitzuteilen, dass zwischen CRISPR/Cas und einer konventionell gezüchteten Sorte kein Unterschied hinsichtlich des bestehenden Risikopotenzials und hinsichtlich einer unterschiedlichen Zulassungsbeschränkung gemacht werden könnte. Ein unterschiedliches Gefahrenpotenzial hinsichtlich SDN-1, SDN-2, SDN-3 wäre zu integrieren, wie die Festlegung einer bestimmten Anzahl an genetischen Veränderungen, die darüber bestimmen, ab wann ein Organismus nicht mehr mit einer konventionell gezüchteten Pflanze gleichgestellt werden kann.

Alle anderen Handlungsempfehlungen sprechen für sich selbst.

Die Handlungsempfehlung dieser Arbeit bieten eine Argumentationsgrundlage für eine Zulassung von CRISPR/Cas-Produkten in der EU. Einige Empfehlungen decken sich dabei aus dem kürzlich (Juli 2023) von der EU-Kommission erarbeiteten Vorschlag zum Umgang mit "Neuer Gentechnik" (NGT).

Die EU hat Anfang Juli 2023 einen Entwurf für Verfahren der NGT präsentiert. Dieser soll dem aktuellen Forschungsstand entsprechen. Die EU spricht sich dafür aus, dass die SDN-1-Methode in naher Zukunft von der Gentechnikregulierung befreit werden soll.

Die Änderungsvorschläge der Kommission wurden durch parallellaufende Untersuchungen der Lebensmittelbehörde für Lebensmittelsicherheit im Rahmen der: "Study on the status of new genomic techniques under Union law and in light of the Court of Justice ruling in case C-528/16" (EFSA, 2021) gestützt. Es wird sich ebenfalls für eine weniger stark regulierte Gesetzgebung ausgesprochen.

Für den Fall, dass eine Zulassung weiterhin angestrebt wird, wäre eine deutlich anwendungsorientiertere Forschung möglich. Die EU wäre imstande, in Bezug auf CRISPR/Cas und Genom-Editierung, eigene Lösungen erarbeiten zu können, ohne gegebenenfalls in Abhängigkeiten von EU-ausländischen Standorten zu geraten.

6.5. Begrenzungen

Die Lesenden sollten beachten, dass es sich bei dieser Arbeit um eine Übersichtsarbeit handelt. Relevante Pflanzeigenschaften von Kartoffel und Tomate für die Anwendung von CRISPR/Cas, sowie dabei beteiligte Gene, wurden identifiziert. Unter welchen Bedingungen die Funktion dieser Gene aufgefunden wurde und wie das Wissen im Detail generiert wurde, bleibt unberücksichtigt. Somit stellt eine Limitation dieser Arbeit die detaillierte Ausführung der Anwendung von CRISPR/Cas zur Identifizierung der Genfunktionen in *S. tuberosum* sowie *S. lycopersicum* dar.

Problematisch zu verzeichnen ist, dass der Rahmen der Arbeit sehr weit gefasst ist. Dadurch, dass sich auf zwei Nachtschattengewächse bezogen wurde, war es einerseits möglich *S. tuberosum* und *S. lycopersicum* innerhalb der Gattung hinsichtlich relevanter Pflanzeigenschaften miteinander zu vergleichen, andererseits ergaben sich große Datenmengen, die durch die Anwendung weiterer Interviews den Umfang ausdehnten. Zudem trug die Darstellung von vielen unterschiedlichen Pflanzeigenschaften ebenfalls dazu bei, dass die Arbeit sehr breit aufgestellt und umfangreich ausfällt. Ein einzelner

Lebensmittelbezug sowie die Darstellung weniger Eigenschaften, die durch die Anwendung von CRISPR/Cas hätten verbessert werden können, wären ausreichend gewesen. Diese Eingrenzung hätte eine spezifischere Forschung zugelassen, die auch vermehrt Stoffwechselwege innerhalb der Pflanze berücksichtigt hätte. Aus Gründen der Kapazität wurde kein detaillierter Überblick über jeden der biochemisch ablaufenden Prozesse in den Ziel-Pflanzen gegeben. Es wäre interessant gewesen, die Stoffwechselwege vor und nach der Schlüsselgen-Bearbeitung durch CRISPR/Cas zu untersuchen.

Darüber hinaus ergaben sich Begrenzungen bei der Durchführung der Interviews. Bei der Transkription der Interviews ist ein Informationsverlust möglich, da nicht alle Aussagen zu relevanten Themen in den Ergebnisteil mitaufgenommen werden konnten. Das könnte gegebenenfalls zu Verzerrungen geführt haben.

Es ist zu erwähnen, dass der Fokus der Ergebnisse zur Lebensmittelsicherheit sowie der lebensmittelrechtlichen Beurteilung auf Europa liegt. Die Limitation besteht darin, dass nicht alle Rechtssysteme außerhalb der EU berücksichtigt werden konnten.

Generell sind die Auswirkungen auf Menschen, Tier, Umwelt und Natur schwer zu greifen, weshalb es nicht möglich gewesen ist, eine exakte Folgeneinschätzung zu erarbeiten, die durch die Verwendung von CRISPR/Cas in der Landwirtschaft entstehen könnte.

6.6. Weiterführende Forschung und Zukunftsausblick

Die verwendeten Publikationen und gegebenenfalls auch weiterführende Literatur könnten länderspezifisch eingeordnet werden, um herauszufinden welche Länder weltweit primär an welchen landwirtschaftlichen Produkten Forschung betreiben und vor allem mit welchen Fragestellungen Pflanzeigenschaften bearbeitet werden sollen. Daraus könnte eine globale Einschätzung der Know-how-Verteilung zu der Anwendung von CRISPR/Cas hinsichtlich der Pflanzenzucht und der Landwirtschaft resultieren. Ein länderübergreifender Wissenstransfer sowie internationale Zusammenarbeiten könnten gefördert werden. Darüber hinaus wäre es möglich, einen expliziten Forschungsbedarf zu identifizieren und Themenbereiche auszubauen, denen bisher wenig Aufmerksamkeit zu Teil wurde.

Da es sich bei jedem der drei Experten um deutsche Wissenschaftler handelte, mit Ausnahme eines deutsch-amerikanischen Wissenschaftlers, wäre es durchaus sinnvoll, mit weiteren Forschenden, die außerhalb der EU arbeiten, Interviews zu führen, um genau wie bei der Literaturrecherche die Ergebnisse auf einen weit ausgedehnteren Forschungsstandort anwenden zu können.

Auf vorliegende Arbeit aufbauend bestünde die Möglichkeit weitere Forschung hinsichtlich der Identifizierung von Genfunktionen in Kartoffeln und Tomaten zu betreiben, um die Modifikation der aufgeführten Eigenschaften und gegebenenfalls bisher noch nicht veränderten Eigenschaften weiter zu optimieren und ergänzen zu können. An dieser Stelle wäre es interessant in Erfahrung zu bringen, ob Gene, die sowohl in *S. tuberosum* als auch in *S. lycopersicum* vorkommen, dieselbe Produktivität aufweisen und ob das Zusammenspiel mit unterschiedlichen Genen innerhalb von *S. tuberosum* und *S. lycopersicum* dennoch ähnliche Eigenschaften fördert.

Hierfür wären, auf die theoretische Fragestellung aufbauend, Fragestellungen hilfreich, die in einem experimentellen Umfeld beantwortet werden können, um die gesamte Thematik der Anwendung von CRISPR/Cas bei Kartoffeln und Tomaten ebenfalls aus einer praktischen Umgebung, zum Beispiel im Rahmen eines Forschungsprojektes, bewerten zu können.

7. Schlussfolgerung

Die Untersuchung dieser Masterarbeit hat gezeigt, dass die Veränderung der bisher vorgestellten Pflanzeigenschaften unter Anwendung der CRISPR/Cas-Technologie verallgemeinernd in agronomische- und Nahrungsmiteleigenschaften sowie der Produktion von Industriestoffen unterteilt werden kann. Es wird deutlich, dass die Bemühungen, um angepasste Eigenschaften von Kartoffeln und Tomaten gegenüber agronomischen Anwendungen im Vordergrund steht. Für die Tomaten ist die Studienlage bei Nahrungsmiteleigenschaften wie Geschmacksausprägung besonders hoch. Dabei sind neben den sensorischen Eigenschaften auch gesundheitlich bezogene Inhaltsstoffe maßgeblich. Da die Kartoffel ein Grundnahrungsmittel darstellt, sind für die Weiterverarbeitung tendenziell funktionelle Eigenschaften nachgefragt, sowie eine hohe Qualität hinsichtlich der Lagerstabilität und der potenziell bei der Produktion entstehenden toxischen Stoffe, wie Acrylamid. Bei der Produktion von Industriestoffen mit CRISPR/Cas besitzt die Kartoffel durch ihre stärkehaltigen Inhaltsstoffe ein Alleinstellungsmerkmal gegenüber der Tomate.

Die möglichen Eigenschaften, die mit CRISPR/Cas gezielt verändert werden können, bringen für jede Kulturpflanze einen züchterischen Vorteil und können ebenso den Anforderungen der Landwirtschaft, Lebensmittelindustrie und Verbraucher:Innen gerecht werden. Wie sich die CRISPR/Cas-Technologie auf unterschiedlichen Ebenen der Food Supply Chain auswirkt, führt zur Überprüfung der 1. Hypothese, die besagt, dass die Landwirtschaft, die Lebensmittelindustrie sowie Verbraucher:Innen erheblich von veränderten Pflanzeigenschaften profitieren werden.

Primärproduktion

Der Einsatz von CRISPR/Cas ermöglicht Landwirt:Innen und Pflanzenzüchter:Innen Kulturpflanzen mit vorteilhaften Eigenschaften zu entwickeln. Wie in der konventionellen Züchtung werden Ertrag, Pathogenresistenz, Haltbarkeit oder eine verbesserte Nährstoffzusammensetzung umgesetzt. Damit kann ein effizienterer Umgang mit Ressourcen wie Wasser und Düngemitteln umgegangen werden. Die Landwirtschaft ist imstande produktiver und rentabler zu werden und gleichzeitig Nachhaltigkeitsaspekte wie einen verminderten Einsatz von Pflanzenschutzmitteln berücksichtigen.

Herstellung & Weiterverarbeitung in der Lebensmittelindustrie

Die Lebensmittelindustrie kann einen erheblichen Vorteil aus Pflanzenrohstoffen ziehen, die durch die Einwirkung von CRISPR/Cas entstanden sind. Eigenschaften, die die Beschaffenheit von Endprodukten beeinflussen, wie Textur, Geschmack und Nährstoffzusammensetzung, bestimmen maßgeblich über den Absatz des jeweiligen Produktes. Zudem wäre es denkbar, sofern qualitativ hochwertigere Rohstoffe in die Weiterverarbeitung gehen, den Bedarf an Zusatzstoffen sowie Verarbeitungsschritte gering zu halten.

Transport

Länger haltbare Lebensmittel sind in der Lage über einen längeren Zeitraum transportiert zu werden, ohne dass ein Qualitätsverlust einhergeht. Gerade auf dem Transportweg von Lebensmitteln existieren strenge Kühl- und Lageranforderungen, die strikt reguliert, überprüft und eingehalten werden müssen, damit es zu keiner Beanstandung kommt. Somit könnten Lebensmittelabfälle reduziert und Länder, in denen eine geminderte Versorgungssicherheit herrscht, der Zugang zu frischen Lebensmitteln geboten werden.

Sell & Buy

Auch Konsument:Innen könnten verbesserte ernährungsphysiologische Profile in Lebensmitteln sowie länger frische Lebensmittel durch den Einsatz der CRISPR/Cas Technologie im LEH vorfinden. Neben einer ohnehin breiten Produktpalette von Auswahlmöglichkeiten in Supermärkten bestünde die Chance für einen zunehmenden Verzehr von gesünderen Lebensmitteln.

Die beiden weiteren Hypothesen ergaben sich aus den Interviewergebnissen. Die zweite Hypothese wird von Umweltschutzorganisationen und der Biobranche stark abgelehnt. Die Reaktion auf die jüngsten EU-Vorschläge von Juli 2023 für neue gentechnische Methoden wie CRISPR/Cas haben das gezeigt. Die Vorschläge werden im Biolandbau nicht umgesetzt werden können. Gerade an dieser Stelle wäre es sinnvoll, wenn sich der Biolandbau offener positionieren würde und mit CRISPR/Cas nachhaltiger produziert werden könnte.

Die 2. Hypothese besagt, dass die Anwendung von CRISPR/Cas bei landwirtschaftlichen Nutzpflanzen und Obstkulturen für Menschen, Tier, Umwelt und Natur bedenkenlos in Europa eingesetzt und somit freigesetzt und Inverkehr gebracht werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Hypothese nur teilweise bestätigt werden. Die Experten konnten Bedenken abschwächen und auch im Hinblick auf bereits bestehende Verfahren verweisen, deren Gefahrenpotenzial für Mensch und Umwelt ähnlich, wenn nicht höher, eingeschätzt

wird als das von CRISPR/Cas-Technologien. Das führt zu der Beantwortung der dritten Hypothese.

Die dritte Hypothese besagt, dass Organismen, die durch CRISPR/Cas verändert werden denselben, wenn nicht mehr Anspruch auf eine Befreiung der Gentechnik-Regulierung haben als Organismen, die durch ungerichtete Mutagenese entstanden sind.

Durch die bereits erwähnten, kürzlich vorgelegten Änderungsvorschläge der Europäischen Union zur Regulierung von Pflanzen, die mit neuen gentechnischen Methoden hergestellt wurden, konnte die Hypothese im Zusammenhang mit der SDN1-Methode eindeutig beantwortet werden. Sowohl die Wissenschaft, die EFSA als auch die Europäische Union sind sich einig, dass Pflanzen, bei denen Mutationen durch Verfahren wie CRISPR/Cas induziert wurden und diese Mutationen ebenso durch natürliche Mutationen hätten auftreten können, von der bestehenden Gentechnik-Regulierung ausgenommen werden sollten.

Insgesamt kann betont werden, dass die Strategie, die hinter der CRISPR/Cas-Technologie steckt, um punktspezifische Genveränderungen im Pflanzengenom zu erreichen, eine aufstrebende Zukunft in molekularbiologischen und biotechnologischen Bereichen aufweisen wird.

Wenn CRISPR/Cas eine akzeptierte Anwendung in Europa darstellen würde, könnten bisher ungenutzte genetische Eigenschaften aus bestehenden Genbanken für eine gesteigerte genetische Vielfalt von Kulturpflanzen sorgen. Vorausgesetzt, dass Gene mit nützlichen Eigenschaften vorliegen, würde CRISPR/Cas eine bedeutende Rolle spielen und wäre schwer zu vernachlässigen. Es ist zu erwarten, dass die konventionelle Züchtung dennoch nicht vollständig obsolet wird. Länder, die die Genom-Editierung nutzen, könnten erhebliche Wettbewerbsvorteile erzielen, die darüber entscheiden können, inwieweit ein Mitbewerber erfolgreich ist.

EU-Produzenten wären im direkten Nachteil, wenn sie von dieser Entwicklung ausgeschlossen wären.

Literaturverzeichnis

Abeuova, L., Kali, B., Tussipkan, D., Akhmetollayeva, A., Ramankulov, Y., & Manabayeveva, S. (2023). CRISPR/Cas9-mediated multiple guide RNA-targeted mutagenesis in the potato. *Transgenic Research*, 2–4. Scopus. <https://doi.org/10.1007/s11248-023-00356-8>

Ahmar, S., Gill, R. A., Jung, K.-H., Faheem, A., Qasim, M. U., Mubeen, M., & Zhou, W. (2020). Conventional and Molecular Techniques from Simple Breeding to Speed Breeding in Crop Plants: Recent Advances and Future Outlook. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/ijms21072590>

Alghuthaymi, M. A., Ahmad, A., Khan, Z., Khan, S. H., Ahmed, F. K., Faiz, S., Nepovimova, E., Kuča, K., & Abd-Elsalam, K. A. (2021). Exosome/Liposome-like Nanoparticles: New Carriers for CRISPR Genome Editing in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 1. <https://doi.org/10.3390/ijms22147456>

Andersson, M., Turesson, H., Nicolia, A., Fält, A.-S., Samuelsson, M., & Hofvander, P. (2017). Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Reports*, 36(1), 117–118. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2062-3>

Applicability of the EFSA Opinion on site-directed nucleases type 3 for the safety assessment of plants developed using site-directed nucleases type 1 and 2 and oligonucleotide-directed mutagenesis | EFSA. (2020, November 24). <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/6299>

Bansal, M., & Wani, S. H. (2022). Virus-Mediated Delivery of CRISPR/CAS9 System in Plants. In S. H. Wani & G. Hensel (Hrsg.), *Genome Editing: Current Technology Advances and Applications for Crop Improvement* (S. 197–203). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-08072-2_10

Bari, V. K., Nassar, J. A., & Aly, R. (2021). CRISPR/Cas9 mediated mutagenesis of MORE AXILLARY GROWTH 1 in tomato confers resistance to root parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca*. *Scientific Reports*, 11(1). Scopus. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82897-8>

Bari, V. K., Nassar, J. A., Kheredin, S. M., Gal-On, A., Ron, M., Britt, A., Steele, D., Yoder, J., & Aly, R. (2019). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8 in tomato provides resistance against the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca*. *Scientific Reports*, 9(1). Scopus. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47893-z>

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5819), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>

Bestehende Leitliniendokumente für die Bewertung der Genomeditierung bei Pflanzen | EFSA. (2020, November 24). <https://www.efsa.europa.eu/de/news/existing-guidance-appropriate-assessment-genome-editing-plants>

BLE. (2022, November 18). *BLE - Pressemitteilungen—Kartoffelbilanz 2021/22: Bundesbürger essen wieder weniger Speisefrischkartoffeln.* [https://www.ble.de/SharedDocs/Pressemittellungen/DE/2022/221118_Kartoffelbilanz.html#:~:text=Nach%20vorl%C3%A4ufigen%20Angaben%20des%20Bundesinformationszentrums,oder%20Chips%20\(%2B200%20Gramm\).](https://www.ble.de/SharedDocs/Pressemittellungen/DE/2022/221118_Kartoffelbilanz.html#:~:text=Nach%20vorl%C3%A4ufigen%20Angaben%20des%20Bundesinformationszentrums,oder%20Chips%20(%2B200%20Gramm).)

BLE. (2023, Juni 14). *BLE - Pressemitteilungen—Gemüseverbrauch: 27 Prozent sind Tomaten*. https://www.ble.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/DE/2023/230614_Tomaten.html#:~:text=Mit%20einem%20Verbrauch%20von%20%C3%BCber,seit%20dem%20Jahr%202019%20fort.

Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, *151*(8), 2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>

Bouzroud, S., Gasparini, K., Hu, G., Barbosa, M. A. M., Rosa, B. L., Fahr, M., Bendaou, N., Bouzayen, M., Zsögön, A., Smouni, A., & Zouine, M. (2020). Down regulation and loss of auxin response factor 4 function using CRISPR/Cas9 alters plant growth, stomatal function and improves tomato tolerance to salinity and osmotic stress. *Genes*, *11*(3), 1–4. Scopus. <https://doi.org/10.3390/genes11030272>

Brouns, S. J. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J. H., Snijders, A. P. L., Dickman, M. J., Makarova, K. S., Koonin, E. V., & van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, *321*(5891), 960–964. <https://doi.org/10.1126/science.1159689>

Brunner, J., Dobelmann, A., Kirst, S., & Prause, L. (2019). *Wörterbuch Land- und Rohstoffkonflikte*. transcript Verlag.

Buchholz, K., & Collins, J. (2022). *Eine kleine Geschichte der Biotechnologie: Von Bier und Wein zu Penicillin, Insulin und RNA-Impfstoffen*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-63988-7>

Cathomen, T., & Puchta, H. (Hrsg.). (2018). *CRISPR/Cas9 – Einschneidende Revolution in der Gentechnik*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-57441-6>
Clemens, S. (2021). *Biologie in unserer Zeit*. *4*, 341–344. <https://doi.org/DOI:10.11576/biuz-4821>

Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>

Damerum, A., Chapman, M. A., & Taylor, G. (2020). Innovative breeding technologies in lettuce for improved post-harvest quality. *Postharvest Biology and Technology*, *168*, 161, 111266. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111266>

Datta, R. R., & Rister, J. (2022). The power of the (imperfect) palindrome: Sequence-specific roles of palindromic motifs in gene regulation. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, *44*(4), e2100191. <https://doi.org/10.1002/bies.202100191>

Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, *471*(7340), 602–607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>

Demirer, G. S., Silva, T. N., Jackson, C. T., Thomas, J. B., W. Ehrhardt, D., Rhee, S. Y., Mortimer, J. C., & Landry, M. P. (2021). Nanotechnology to advance CRISPR–Cas genetic engineering of plants. *Nature Nanotechnology*, *16*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00854-y>

- Dima, O., Hubert Bocken, René Custers, Dirk Inzé, & Pere Puigdomènech. (2020). *Genome Editing for Crop Improvement* (1. Aufl.). ALLEA. <https://doi.org/10.26356/gen-editing-crop>
- Ezura, H. (2022). Letter to the Editor: The World's First CRISPR Tomato Launched to a Japanese Market: The Social-Economic Impact of its Implementation on Crop Genome Editing. *Plant and Cell Physiology*, 63(6), 731–733. Scopus. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac048>
- Fehse, B. (2018). 4. Genomeditierung durch CRISPR und Co. In L. Marx-Stölting, H. Schickl, & M. Zenke (Hrsg.), *Stammzellforschung* (S. 223,225,227). Nomos Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG. <https://doi.org/10.5771/9783845287720-96>
- Fehse, B., Hucho, F., Bartfeld, S., Clemens, S., Erb, T., Fangerau, H., Hampel, J., Korte, M., Marx-Stölting, L., Mundlos, S., Osterheider, A., Pichl, A., Reich, J., Schickl, H., Schick-tanz, S., Taupitz, J., Walter, J., Winkler, E., & Zenke, M. (Hrsg.). (2021). *Fünfter Gentechnologiebericht: Sachstand und Perspektiven für Forschung und Anwendung*. Nomos Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG. <https://doi.org/10.5771/9783748927242>
- Feldmann, F., Piorr, A., & Vogler, U. (2023). *Die Formen der urbanen Landwirtschaft in Deutschland Typology of urban agriculture in Germany*. 15. <https://doi.org/10.5073/JfK.2023.01-02.03>
- Flemmer, D. A. (2011). *Nervennahrung: Das richtige Essen für starke Nerven und ein gutes Gedächtnis*. Schlütersche.
- Föllner, M., & Stangl, G. I. (Hrsg.). (2021). *Ernährung—Physiologische und Praktische Grundlagen*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-61667-3>
- Friedrichs, S., Takasu, Y., Kearns, P., Dagallier, B., Oshima, R., Schofield, J., & Moreddu, C. (2019). An overview of regulatory approaches to genome editing in agriculture. *Bio-technology Research and Innovation*, 3(2), 208–210. <https://doi.org/10.1016/j.bi-ori.2019.07.001>
- Ganapathi', T. R., Suprasanna', P., Rao', P. S., & Bapat', V. A. (2004). *Tobacco (Nicotiana tabacum L.)-A model system for tissue culture interventions and genetic engineering*. 3, 171–184. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/7722>
- García-Murillo, L., Valencia-Lozano, E., Priego-Ranero, N. A., Cabrera-Ponce, J. L., Duarte-Aké, F. P., Vizuet-de-Rueda, J. C., Rivera-Toro, D. M., Herrera-Ubaldo, H., de Folter, S., & Alvarez-Venegas, R. (2023). CRISPRa-mediated transcriptional activation of the SIPR-1 gene in edited tomato plants. *Plant Science*, 329, 111617. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111617>
- Garneau, J. E., Dupuis, M.-È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. H., & Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), Article 7320. <https://doi.org/10.1038/nature09523>
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9–crRNA ribonucleo-protein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(39), E2579–E2586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>

Gehrke, F., Schindele, A., & Puchta, H. (2022). Nonhomologous end joining as key to CRISPR/Cas-mediated plant chromosome engineering. *Plant Physiology*, 188(4), 1769–1779. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab572>

Gelinsky, E., & Hilbeck, A. (2018). European Court of Justice ruling regarding new genetic engineering methods scientifically justified: A commentary on the biased reporting about the recent ruling. *Environmental Sciences Europe*, 30(1), 2–9. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0182-9>

Gianoglio, S., Comino, C., Moglia, A., Acquadro, A., García-Carpintero, V., Diretto, G., Sevi, F., Rambla, J. L., Dono, G., Valentino, D., Moreno-Giménez, E., Fullana-Pericàs, M., Conesa, M. A., Galmés, J., Lanteri, S., Mazzucato, A., Orzáez, D., & Granell, A. (2022). In-Depth Characterization of greenflesh Tomato Mutants Obtained by CRISPR/Cas9 Editing: A Case Study With Implications for Breeding and Regulation. *Frontiers in Plant Science*, 13. Scopus. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.936089>

Gökdemir, G., Seçgin, Z., Uluisik, S., & Kavas, M. (2022). CRISPR/Cas9 knock-out of SIPHD_MS1 (Solyc04g008420) gene results in complete male sterility in tomato. *Plant Growth Regulation*, 98(2), 329–341. Scopus. <https://doi.org/10.1007/s10725-022-00869-y>

González, M. N., Massa, G. A., Andersson, M., Storani, L., Olsson, N., Décima Oneto, C. A., Hofvander, P., & Feingold, S. E. (2023). CRISPR/Cas9 Technology for Potato Functional Genomics and Breeding. *Methods in Molecular Biology*, 2653, 333–361. Scopus. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3131-7_21

González, M. N., Massa, G. A., Andersson, M., Turesson, H., Olsson, N., Fält, A.-S., Storani, L., Décima Oneto, C. A., Hofvander, P., & Feingold, S. E. (2020). Reduced Enzymatic Browning in Potato Tubers by Specific Editing of a Polyphenol Oxidase Gene via Ribonucleoprotein Complexes Delivery of the CRISPR/Cas9 System. *Frontiers in Plant Science*, 10, 2–5, 8. Scopus. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01649>

Graw, J. (2015). *Genetik* (6. Aufl.). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-44817-5>

Guo, X., Zhao, J., Chen, Z., Qiao, J., Zhang, Y., Shen, H., & Hu, Z. (2022). CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of SICMT4 causes changes in plant architecture and reproductive organs in tomato. *Horticulture Research*, 9, 11–12. Scopus. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac081>

Gupta, R. M., & Musunuru, K. (2014). Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(10), 4154–4161. <https://doi.org/10.1172/JCI72992>

Hameed, A., Mehmood, M. A., Shahid, M., Fatma, S., Khan, A., & Ali, S. (2020). Prospects for potato genome editing to engineer resistance against viruses and cold-induced sweetening. *GM Crops and Food*, 11(4), 185–205. Scopus. <https://doi.org/10.1080/21645698.2019.1631115>

Hardt, A. (2019). *Technikfolgenabschätzung des CRISPR/Cas-Systems: Über die Anwendung in der menschlichen Keimbahn*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG.

Health claims | EFSA. (2023, Juli 27). <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/health-claims>

- Heberer, B. (2021). *Grüne Gentechnik: Hintergründe, Chancen und Risiken* (2. Aufl.). Springer Fachmedien Wiesbaden. <https://doi.org/10.1007/978-3-658-35032-1>
- Heckmann, C. M., & Paradisi, F. (2020). Looking Back: A Short History of the Discovery of Enzymes and How They Became Powerful Chemical Tools. *ChemCatChem*, 12(24), 6082–6102. <https://doi.org/10.1002/cctc.202001107>
- Helferich, C. (2022). Leitfaden- und Experteninterviews. In N. Baur & J. Blasius (Hrsg.), *Handbuch Methoden der empirischen Sozialforschung* (S. 875–879, 881–884). Springer Fachmedien Wiesbaden. https://doi.org/10.1007/978-3-658-37985-8_55
- Hermeling, W., Nachtmann, K., & Scholwin, F. (2023). *Biogas – ein Taschenbuch für die Erzeugerpraxis: Erzeugerwissen, Aufbereitung und Vermarktung*. Springer Fachmedien Wiesbaden. <https://doi.org/10.1007/978-3-658-39605-3>
- Hölzl, G., Rezaeva, B. R., Kumlehn, J., & Dörmann, P. (2023). Ablation of glucosinolate accumulation in the oil crop *Camelina sativa* by targeted mutagenesis of genes encoding the transporters GTR1 and GTR2 and regulators of biosynthesis MYB28 and MYB29. *Plant Biotechnology Journal*, 21(1), 189–194. <https://doi.org/10.1111/pbi.13936>
- Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5962), 167–170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>
- Hou, X., Guo, X., Zhang, Y., & Zhang, Q. (2023). CRISPR/Cas genome editing system and its application in potato. *Frontiers in Genetics*, 14, 2–6. Scopus. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1017388>
- Hwang, H.-H., Yu, M., & Lai, E.-M. (2017). Agrobacterium-mediated plant transformation: Biology and applications. *The Arabidopsis Book*, 15, e0186. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>
- Ijaz, S., Haq, I. U., & Razzaq, H. A. (2023). Mutation introduced in DDTFR10/A gene of ethylene response element-binding protein (EREBP) family through CRISPR/Cas9 genome editing confers increased Fusarium wilt tolerance in tomato. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 29(1), 1–10. Scopus. <https://doi.org/10.1007/s12298-022-01273-6>
- Ito, Y., Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M., Mikami, M., & Toki, S. (2015). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 467(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.117>
- Jäkel, L. (2021). *Faszination der Vielfalt des Lebendigen—Didaktik des Draußen-Lernens*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-62383-1>
- Jang, G., & Joung, Y. H. (2019). CRISPR/Cas-mediated genome editing for crop improvement: Current applications and future prospects. *Plant Biotechnology Reports*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11816-018-0509-4>
- John, S. (2021). *Europäische Themen in deutschen Parteiorganisationen: Relevanz und innerparteiliche Aufgabenteilung*. Springer Fachmedien Wiesbaden. <https://doi.org/10.1007/978-3-658-34797-0>

- Jung, Y. J., Kim, D. H., Lee, H. J., Nam, K. H., Bae, S., Nou, I. S., Cho, Y.-G., Kim, M. K., & Kang, K. K. (2020). Knockout of slms10 gene (Soly02g079810) encoding bhlh transcription factor using crispr/cas9 system confers male sterility phenotype in tomato. *Plants*, 9(9), 1–13. Scopus. <https://doi.org/10.3390/plants9091189>
- Jürkenbeck, K., Spiller, A., & Meyerding, S. G. H. (2019). Tomato attributes and consumer preferences – a consumer segmentation approach. *British Food Journal*, 122(1), 328–344. <https://doi.org/10.1108/BFJ-09-2018-0628>
- Kadereit, J. W., Körner, C., Nick, P., & Sonnewald, U. (2021). *Strasburger – Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften* (38. Aufl.). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-61943-8>
- Kawaguchi, K., Takei-Hoshi, R., Yoshikawa, I., Nishida, K., Kobayashi, M., Kusano, M., Lu, Y., Ariizumi, T., Ezura, H., Otagaki, S., Matsumoto, S., & Shiratake, K. (2021). Functional disruption of cell wall invertase inhibitor by genome editing increases sugar content of tomato fruit without decrease fruit weight. *Scientific Reports*, 11(1), 1–9. Scopus. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00966-4>
- Kellermann, K. (2020). *Die Zukunft der Landwirtschaft: Konventioneller, gentechnikbasierter und ökologischer Landbau im umfassenden Vergleich*. Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-658-30359-4>
- Kempken, F. (2020). *Gentechnik bei Pflanzen: Chancen und Risiken* (5. Aufl.). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-60744-2>
- Kempken, F., & Kempken, R. (2012). *Gentechnik bei Pflanzen: Chancen und Risiken* (4. Aufl.). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-24818-4>
- Kieu, N. P., Lenman, M., Wang, E. S., Petersen, B. L., & Andreasson, E. (2021). Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes. *Scientific Reports*, 11(1). Scopus. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83972-w>
- Kim, J. Y., Kim, J. H., Jang, Y. H., Yu, J., Bae, S., Kim, M.-S., Cho, Y.-G., Jung, Y. J., & Kang, K. K. (2023). Transcriptome and Metabolite Profiling of Tomato SGR-Knockout Null Lines Using the CRISPR/Cas9 System. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1). Scopus. <https://doi.org/10.3390/ijms24010109>
- Knoop, M., & Otter, V. (2019). *Der Markt für Obst und Gemüse*. 108,112.
- Knott, G. J., & Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*, 361(6405), 866–869. <https://doi.org/10.1126/science.aat5011>
- Kumar, A., Kumar, V., Gull, A., & Nayik, G. A. (2020). Tomato (*Solanum Lycopersicon*). In G. A. Nayik & A. Gull (Hrsg.), *Antioxidants in Vegetables and Nuts—Properties and Health Benefits* (S. 191–207). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7470-2_10
- Kurreck, jens, & Beck, B. (2019). *Kursbuch Bioethik*. Universitätsverlag der TU Berlin.
- Kurreck, J., Engels, J. W., & Lottspeich, F. (Hrsg.). (2022). *Bioanalytik* (4. Aufl.). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-61707-6>
- Lander, E. S. (2016). The Heroes of CRISPR. *Cell*, 164(1–2), 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.041>

- Li, C., Chu, W., Gill, R. A., Sang, S., Shi, Y., Hu, X., Yang, Y., Zaman, Q. U., & Zhang, B. (2023). Computational Tools and Resources for CRISPR/Cas Genome Editing. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 21(1), 108–126. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2022.02.006>
- Li, J., Yu, X., Zhang, C., Li, N., & Zhao, J. (2022). The application of CRISPR/Cas technologies to Brassica crops: Current progress and future perspectives. *ABIOTECH*, 3(2), 146–161. <https://doi.org/10.1007/s42994-022-00076-3>
- Li, Q., Feng, Q., Snouffer, A., Zhang, B., Rodríguez, G. R., & van der Knaap, E. (2022). Increasing Fruit Weight by Editing a Cis-Regulatory Element in Tomato KLUH Promoter Using CRISPR/Cas9. *Frontiers in Plant Science*, 13. Scopus. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.879642>
- Li, R., Li, R., Li, X., Fu, D., Zhu, B., Tian, H., Luo, Y., & Zhu, H. (2018). Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biotechnology Journal*, 16(2), 415–427. <https://doi.org/10.1111/pbi.12781>
- Li, R., Liu, C., Zhao, R., Wang, L., Chen, L., Yu, W., Zhang, S., Sheng, J., & Shen, L. (2019). CRISPR/Cas9-Mediated SINPR1 mutagenesis reduces tomato plant drought tolerance. *BMC Plant Biology*, 19(1). Scopus. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1627-4>
- Li, R., Maioli, A., Yan, Z., Bai, Y., Valentino, D., Milani, A. M., Pompili, V., Comino, C., Lanteri, S., Moglia, A., & Acquadro, A. (2022). CRISPR/Cas9-Based Knock-Out of the PMR4 Gene Reduces Susceptibility to Late Blight in Two Tomato Cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 3–8. Scopus. <https://doi.org/10.3390/ijms232314542>
- Li, R., Zhang, L., Wang, L., Chen, L., Zhao, R., Sheng, J., & Shen, L. (2018). Reduction of Tomato-Plant Chilling Tolerance by CRISPR-Cas9-Mediated SICBF1 Mutagenesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(34), 9042–9051. Scopus. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02177>
- Li, X., Wang, Y., Chen, S., Tian, H., Fu, D., Zhu, B., Luo, Y., & Zhu, H. (2018). Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–10. Scopus. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00559>
- Liu, B., Gu, W., Yang, Y., Lu, B., Wang, F., Zhang, B., & Bi, J. (2021). Promoting potato as staple food can reduce the carbon–land–water impacts of crops in China. *Nature Food*, 2(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00337-2>
- Liu, J., Wang, S., Wang, H., Luo, B., Cai, Y., Li, X., Zhang, Y., & Wang, X. (2021). Rapid generation of tomato male-sterile lines with a marker use for hybrid seed production by CRISPR/Cas9 system. *Molecular Breeding*, 41(3). Scopus. <https://doi.org/10.1007/s11032-021-01215-2>
- Liu, L., Zhang, J., Xu, J., Li, Y., Guo, L., Wang, Z., Zhang, X., Zhao, B., Guo, Y.-D., & Zhang, N. (2020). CRISPR/Cas9 targeted mutagenesis of SILBD40, a lateral organ boundaries domain transcription factor, enhances drought tolerance in tomato. *Plant Science*, 301, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110683>
- Londenberg, A., Bartels, F.-M., Kqakpo Quaye, J., Boch, J., Ripken, T., & Heinemann, D. (2020). Targeted genome editing in potato protoplast via optical delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. 11345. Scopus. <https://doi.org/10.1117/12.2555288>

- Lucioli, A., Tavazza, R., Baima, S., Fatyol, K., Burgyan, J., & Tavazza, M. (2022). CRISPR-Cas9 Targeting of the eIF4E1 Gene Extends the Potato Virus Y Resistance Spectrum of the *Solanum tuberosum* L. cv. Desirée. *Frontiers in Microbiology*, 13. Scopus. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.873930>
- Ly, D. N. P., Iqbal, S., Fosu-Nyarko, J., Milroy, S., & Jones, M. G. K. (2023). Multiplex CRISPR-Cas9 Gene-Editing Can Deliver Potato Cultivars with Reduced Browning and Acrylamide. *Plants*, 12(2), 2–16. Scopus. <https://doi.org/10.3390/plants12020379>
- Ma, J., Zheng, A.-H., Zhou, P., Yuan, Q., Wu, R., Chen, C.-Y., Wu, X.-Z., Zhang, F., & Sun, B. (2019). Targeted editing of the StPDS gene using the CRISPR/Cas9 system in tetraploid potato. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31(7), 482–485. Scopus. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2019.v31.i7.1974>
- Makhotenko, A. V., Khromov, A. V., Snigir, E. A., Makarova, S. S., Makarov, V. V., Suprunova, T. P., Kalinina, N. O., & Taliansky, M. E. (2019). Functional Analysis of Coilin in Virus Resistance and Stress Tolerance of Potato *Solanum tuberosum* using CRISPR-Cas9 Editing. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 484(1), 88–91. Scopus. <https://doi.org/10.1134/S1607672919010241>
- Manghwar, H., Li, B., Ding, X., Hussain, A., Lindsey, K., Zhang, X., & Jin, S. (2020). CRISPR/Cas Systems in Genome Editing: Methodologies and Tools for sgRNA Design, Off-Target Evaluation, and Strategies to Mitigate Off-Target Effects. *Advanced Science*, 7(6), 1902312. <https://doi.org/10.1002/advs.201902312>
- Mäntele, W. (2021). *Ein naturwissenschaftlicher Blick auf populäres Halbwissen*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-63483-7>
- Matissek, R., & Fischer, M. (2021). *Lebensmittelanalytik (7. Aufl.)*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-63409-7>
- Mayring, P., & Fenzl, T. (2019). Qualitative Inhaltsanalyse. In N. Baur & J. Blasius (Hrsg.), *Handbuch Methoden der empirischen Sozialforschung* (S. 642–643). Springer Fachmedien. https://doi.org/10.1007/978-3-658-21308-4_42
- Mey, G., & Mruck, K. (Hrsg.). (2010). *Handbuch qualitative Forschung in der Psychologie* (1. Aufl.). VS Verlag für Sozialwissenschaften.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Motohashi, N. (Hrsg.). (2008). *Bioactive Heterocycles VI: Flavonoids and Anthocyanins in Plants, and Latest Bioactive Heterocycles I* (Bd. 15). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-79218-5>
- Nagamine, A., Takayama, M., & Ezura, H. (2023). Genetic improvement of tomato using gene editing technologies. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 98(1), 1. Scopus. <https://doi.org/10.1080/14620316.2022.2091489>

- Nakayasu, M., Akiyama, R., Lee, H. J., Osakabe, K., Osakabe, Y., Watanabe, B., Sugimoto, Y., Umemoto, N., Saito, K., Muranaka, T., & Mizutani, M. (2018). Generation of α -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the St16DOX gene. *Plant Physiology and Biochemistry*, 131, 70–77. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.026>
- Nguyen, N. H., Bui, T. P., Le, N. T., Nguyen, C. X., Le, M. T. T., Dao, N. T., Phan, Q., Van Le, T., To, H. M. T., Pham, N. B., Chu, H. H., & Do, P. T. (2023). Disrupting Sc-uORFs of a transcription factor bZIP1 using CRISPR/Cas9 enhances sugar and amino acid contents in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Planta*, 257(3), 3–5. Scopus. <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04089-0>
- Niemann, H., & Wrenzycki, C. (Hrsg.). (2023). *Biotechnologie bei Nutztieren 2: Aufkommende Züchtungstechnologien*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-26042-1>
- Noureen, A., Khan, M. Z., Amin, I., Zainab, T., & Mansoor, S. (2022). CRISPR/Cas9-Mediated Targeting of Susceptibility Factor eIF4E-Enhanced Resistance Against Potato Virus Y. *Frontiers in Genetics*, 13, 1–4. Scopus. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.922019>
- Ortigosa, A., Gimenez-Ibanez, S., Leonhardt, N., & Solano, R. (2019). Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of SIJAZ2. *Plant Biotechnology Journal*, 17(3), 665–669. Scopus. <https://doi.org/10.1111/pbi.13006>
- Perk, E. A., Arruebarrena Di Palma, A., Colman, S., Mariani, O., Cerrudo, I., D'Ambrosio, J. M., Robuschi, L., Pombo, M. A., Rosli, H. G., Villareal, F., & Laxalt, A. M. (2023). CRISPR/Cas9-mediated phospholipase C 2 knock-out tomato plants are more resistant to *Botrytis cinerea*. *Planta*, 257(6), 2–5. Scopus. <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04147-7>
- Pfotenhauer, A. C., Occhialini, A., Harbison, S. A., Li, L., Piatek, A. A., Luckett, C. R., Yang, Y., Stewart, C. N., Jr., & Lenaghan, S. C. (2023). Genome-Editing of FtsZ1 for Alteration of Starch Granule Size in Potato Tubers. *Plants*, 12(9). Scopus. <https://doi.org/10.3390/plants12091878>
- Pramanik, D., Shelake, R. M., Park, J., Kim, M. J., Hwang, I., Park, Y., & Kim, J.-Y. (2021). CRISPR/Cas9-mediated generation of pathogen-resistant tomato against tomato yellow leaf curl virus and powdery mildew. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–18. Scopus. <https://doi.org/10.3390/ijms22041878>
- Qaim, M. (2020). Role of New Plant Breeding Technologies for Food Security and Sustainable Agricultural Development. *Applied Economic Perspectives and Policy*, 42(2), 131–132. <https://doi.org/10.1002/aep.13044>
- Quenouille, J., Vassilakos, N., & Moury, B. (2013). Potato virus Y: A major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity. *Molecular Plant Pathology*, 14(5), 439–452. <https://doi.org/10.1111/mpp.12024>
- Raupp, M. G. (2017). *Agrarlexikon mit den wichtigsten Begriffen zur Landwirtschaft im europäischen Umfeld: Bedeutung in deutscher und englischer Sprache erklärt*. Madora GmbH & Lörrach International e.V.

Razzaq, H. A., Ijaz, S., Haq, I. U., & Khan, I. A. (2022). Functional inhibition of the StERF3 gene by dual targeting through CRISPR/Cas9 enhances resistance to the late blight disease in *Solanum tuberosum* L. *Molecular Biology Reports*, 49(12), 3–9, 11675–11684. Scopus. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07958-1>

Rimbach, G., Nagursky, J., & Erbersdobler, H. F. (2015). *Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-46280-5>

Roberts, R. J. (2005). How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(17), 5905–5908. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500923102>

Rösch, R. (2023, Juli 25). *Tomaten: Gesund essen*. <https://www.bzfe.de/lebensmittel/vom-acker-bis-zum-teller/tomaten/tomaten-gesund-essen/>

Rösch, R., Frühschütz, L., & Icking, J. (2019, Juli 22). *Kartoffeln: Gesund essen*. <https://www.bzfe.de/lebensmittel/vom-acker-bis-zum-teller/kartoffeln/kartoffeln-gesund-essen/>

Rösemann, U. (2020). Pommes und Kartoffelchips – der Siegeszug einer Stärkeknolle. *Biologie in unserer Zeit*, 50(6), 457–458. <https://doi.org/10.1002/biuz.202070618>

Santillán Martínez, M. I., Bracuto, V., Koseoglou, E., Appiano, M., Jacobsen, E., Visser, R. G. F., Wolters, A.-M. A., & Bai, Y. (2020). CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the tomato susceptibility gene PMR4 for resistance against powdery mildew. *BMC Plant Biology*, 20(1). Scopus. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02497-y>

Sato, S., Tabata, S., Hirakawa, H., Asamizu, E., Shirasawa, K., Isobe, S., Kaneko, T., Nakamura, Y., Shibata, D., Aoki, K., Egholm, M., Knight, J., Bogden, R., Li, C., Shuang, Y., Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Liu, X., ... Universitat Pompeu Fabra. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), Article 7400. <https://doi.org/10.1038/nature11119>

Schmidt, O. (2017). *Genetik und Molekularbiologie*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-50274-7>

Secgin, Z., Uluisik, S., Yıldırım, K., Abdulla, M. F., Mostafa, K., & Kavas, M. (2022). Genome-Wide Identification of the Aconitase Gene Family in Tomato (*Solanum lycopersicum*) and CRISPR-Based Functional Characterization of SIACO2 on Male-Sterility. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 2–5. Scopus. <https://doi.org/10.3390/ijms232213963>

Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Köck, Z., & Daley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. *Communications Biology*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0939-8>

Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Gootenberg, J. S., Semenova, E., Minakhin, L., Joung, J., Konermann, S., Severinov, K., Zhang, F., & Koonin, E. V. (2015). Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Molecular Cell*, 60(3), 385–397. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.008>

- Shu, P., Li, Z., Min, D., Zhang, X., Ai, W., Li, J., Zhou, J., Li, Z., Li, F., & Li, X. (2020). CRISPR/Cas9-Mediated SIMYC2 Mutagenesis Adverse to Tomato Plant Growth and MeJA-Induced Fruit Resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(20), 5529–5538. Scopus. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08069>
- Statista. (2023). *Tomaten: Die zehn größten Produzenten 2021*. Statista. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/1189670/umfrage/erntemengen-wichtiger-anbaulteender-von-tomaten-weltweit/>
- Stewart, M. P., Langer, R., & Jensen, K. F. (2018). Intracellular Delivery by Membrane Disruption: Mechanisms, Strategies, and Concepts. *Chemical reviews*, *118*(16), 7409–7531. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00678>
- Tashkandi, M., Ali, Z., Aljedaani, F., Shami, A., & Mahfouz, M. M. (2018). Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato. *Plant Signaling and Behavior*, *13*(10). Scopus. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1525996>
- Thrän, D., & Moesenfechtel, U. (Hrsg.). (2020). *Das System Bioökonomie* (1. Aufl.). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-60730-5>
- Toinga-Villafuerte, S., Vales, M. I., Awika, J. M., & Rathore, K. S. (2022). CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis of the Granule-Bound Starch Synthase Gene in the Potato Variety Yukon Gold to Obtain Amylose-Free Starch in Tubers. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(9). Scopus. <https://doi.org/10.3390/ijms23094640>
- Tran, M. T., Doan, D. T. H., Kim, J., Song, Y. J., Sung, Y. W., Das, S., Kim, E.-J., Son, G. H., Kim, S. H., Van Vu, T., & Kim, J.-Y. (2021). CRISPR/Cas9-based precise excision of SIHyPRP1 domain(s) to obtain salt stress-tolerant tomato. *Plant Cell Reports*, *40*(6), 999–1011. Scopus. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02622-z>
- Tran, M. T., Son, G. H., Song, Y. J., Nguyen, N. T., Park, S., Thach, T. V., Kim, J., Sung, Y. W., Das, S., Pramanik, D., Lee, J., Son, K.-H., Kim, S. H., Vu, T. V., & Kim, J.-Y. (2023). CRISPR-Cas9-based precise engineering of SIHyPRP1 protein towards multi-stress tolerance in tomato. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1–3. Scopus. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1186932>
- Tröder, S. E., & Zevnik, B. (2022). History of genome editing: From meganucleases to CRISPR. *Laboratory Animals*, *56*(1), 60–68. <https://doi.org/10.1177/0023677221994613>
- Tuncel, A., & Qi, Y. (2022). CRISPR/Cas mediated genome editing in potato: Past achievements and future directions. *Plant Science*, *325*, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111474>
- Tussipkan, D., & Manabayeva, S. A. (2021). Employing CRISPR/Cas Technology for the Improvement of Potato and Other Tuber Crops. *Frontiers in Plant Science*, *12*. Scopus. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.747476>
- Van Eck, J., Keen, P., & Tjahjadi, M. (2019). *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Tomato. In S. Kumar, P. Barone, & M. Smith (Hrsg.), *Transgenic Plants: Methods and Protocols* (S. 225–226). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8778-8_16

- Voigt, B. (2023). *Genomeditierung bei Pflanzen: Rechtsrahmen und Reformoptionen*. Springer Fachmedien Wiesbaden. <https://doi.org/10.1007/978-3-658-41531-0>
- Wang, B., Li, N., Huang, S., Hu, J., Wang, Q., Tang, Y., Yang, T., Asmutola, P., Wang, J., & Yu, Q. (2021). Enhanced soluble sugar content in tomato fruit using CRISPR/Cas9-mediated SIIINVINH1 and SIVPE5 gene editing. *PeerJ*, 9. Scopus. <https://doi.org/10.7717/peerj.12478>
- Wang, D., Samsulrizal, N. H., Yan, C., Allcock, N. S., Craigon, J., Blanco-Ulate, B., Ortega-Salazar, I., Marcus, S. E., Bagheri, H. M., Perez-Fons, L., Fraser, P. D., Foster, T., Fray, R., Paul Knox, J., & Seymour, G. B. (2019). Characterization of CRISPR mutants targeting genes modulating pectin degradation in ripening tomato 1[OPEN]. *Plant Physiology*, 179(2), 544–555. Scopus. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01187>
- Wang, J. Y., Pausch, P., & Doudna, J. A. (2022). Structural biology of CRISPR–Cas immunity and genome editing enzymes. *Nature Reviews Microbiology*, 20(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00739-4>
- Wani, S. H., Samantara, K., Razzaq, A., Kakani, G., & Kumar, P. (2022). Back to the wild: Mining maize (*Zea mays* L.) disease resistance using advanced breeding tools. *Molecular Biology Reports*, 49(6), 5787–5803. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06815-x>
- Wilhelm, R., Bartsch, D., Consmüller, N., de Witte, T., Ehlers, U., Feike, T., Gocht, A., Hartung, F., Kahrmann, J., Kehlenbeck, H., Leggewie, G., Lehnert, H., Ordon, F., Sprink, T., Beer, H., Bloem, E., Hausmann, J., Flachowsky, H., Gathmann, A., & Zetzsche, H. (2022). *Bericht zu möglichen Synergien der Nutzung neuer molekularbiologischer Techniken für eine nachhaltige Landwirtschaft / Report on possible synergies of the use of new genomic techniques for sustainable agriculture*.
- Wirth, D. (2021). *Jahrbuch 2020* (1. Aufl.). Cuvillier Verlag.
- Wünschiers, R. (2019a). *Generation Gen-Schere: Wie begegnen wir der gentechnologischen Revolution?* Springer-Verlag.
- Wünschiers, R. (2019b). *Generation Gen-Schere: Wie begegnen wir der gentechnologischen Revolution?* Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-59048-5>
- Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Zhang, B., Mu, D., Ni, P., Zhang, G., Yang, S., Li, R., Wang, J., Orjeda, G., Guzman, F., Torres, M., Lozano, R., Ponce, O., Martinez, D., De la Cruz, G., Chakrabarti, S. K., Patil, V. U., ... Wageningen University & Research Centre. (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, 475(7355), Article 7355. <https://doi.org/10.1038/nature10158>
- Yadav, A. N. (2020). Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture: Current Research and Future Challenges. In A. N. Yadav, J. Singh, A. A. Rastegari, & N. Yadav (Hrsg.), *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture* (S. 475–482). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38453-1_16
- Yang, H., Ren, S., Yu, S., Pan, H., Li, T., Ge, S., Zhang, J., & Xia, N. (2020). Methods Favoring Homology-Directed Repair Choice in Response to CRISPR/Cas9 Induced-Double Strand Breaks. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/ijms21186461>

- Yang, T., Ali, M., Lin, L., Li, P., He, H., Zhu, Q., Sun, C., Wu, N., Zhang, X., Huang, T., Li, C.-B., Li, C., & Deng, L. (2023). Recoloring tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex gene editing. *Horticulture Research*, *10*(1), 2–6. Scopus. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac214>
- Yasmeen, A., Shakoor, S., Azam, S., Bakhsh, A., Shahid, N., Latif, A., Shahid, A. A., Husnain, T., & Rao, A. Q. (2022). CRISPR/Cas-mediated knockdown of vacuolar invertase gene expression lowers the cold-induced sweetening in potatoes. *Planta*, *256*(6), 1–3. Scopus. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-04022-x>
- Ye, M., Peng, Z., Tang, D., Yang, Z., Li, D., Xu, Y., Zhang, C., & Huang, S. (2018). Generation of self-compatible diploid potato by knockout of S-RNase. *Nature Plants*, *4*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0218-6>
- Yoon, Y.-J., Venkatesh, J., Lee, J.-H., Kim, J., Lee, H.-E., Kim, D.-S., & Kang, B.-C. (2020). Genome Editing of eIF4E1 in Tomato Confers Resistance to Pepper Mottle Virus. *Frontiers in Plant Science*, *11*. Scopus. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01098>
- Yue, J.-J., Hong, C.-Y., Wei, P., Tsai, Y.-C., & Lin, C.-S. (2020). How to start your monocot CRISPR/Cas project: Plasmid design, efficiency detection, and offspring analysis. *Rice*, *13*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0354-2>
- ZEuS Zeitschrift für Europarechtliche Studien. (2023). *ZEuS Zeitschrift für Europarechtliche Studien*, *26*(1), 57–96. <https://doi.org/10.5771/1435-439X-2023-1>
- Zhang, S., Shen, J., Li, D., & Cheng, Y. (2021). Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. *Theranostics*, *11*(2), 614–648. <https://doi.org/10.7150/thno.47007>
- Zheng, Q., Takei-Hoshi, R., Okumura, H., Ito, M., Kawaguchi, K., Otagaki, S., Matsumoto, S., Luo, Z., Zhang, Q., & Shiratake, K. (2022). Genome editing of SIMYB3R3, a cell cycle transcription factor gene of tomato, induces elongated fruit shape. *Journal of Experimental Botany*, *73*(22), 7312–7321. Scopus. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac352>
- Zheng, Z., Ye, G., Zhou, Y., Pu, X., Su, W., & Wang, J. (2021). Editing sterol side chain reductase 2 gene (StSSR2) via CRISPR/Cas9 reduces the total steroidal glycoalkaloids in potato. *All Life*, *14*(1), 401–413. Scopus. <https://doi.org/10.1080/26895293.2021.1925358>
- Zhi, J., Liu, X., Li, D., Huang, Y., Yan, S., Cao, B., & Qiu, Z. (2020). CRISPR/Cas9-mediated SIAN2 mutants reveal various regulatory models of anthocyanin biosynthesis in tomato plant. *Plant Cell Reports*, *39*(6), 799–806. Scopus. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02531-1>
- Ziegler, M., & Senser, S. (2023). *BLE - Nationales Fachprogramm Pflanzen*. https://www.ble.de/DE/Themen/Landwirtschaft/Biologische-Vielfalt/Nationales-Fachprogramm-Pflanzen/nationales-fachprogramm-pflanzen_node.html
- Zsögön, A., Čermák, T., Naves, E. R., Notini, M. M., Edel, K. H., Weinl, S., Freschi, L., Voytas, D. F., Kudla, J., & Peres, L. E. P. (2018). De novo domestication of wild tomato using genome editing. *Nature Biotechnology*, *36*(12), 1211–1216. Scopus. <https://doi.org/10.1038/nbt.4272>

Anhang

7.1. Anhang I - Theorie

Unterschiedliche Cas-Nukleasen mit ihren Ursprungsorganismen

CRISPR NUKLEASE	URSPRUNGSORGANISMUS	PAM SEQUENZ (5-3')
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i>	NGG
SaCas9	<i>Staphylococcus aureus</i>	NGRRT
NmeCas9	<i>Neisseria meningitidis</i>	NNNNGATT
CjCas9	<i>Capylobacter jejuni</i>	NNNNRYAC
StCas9	<i>Streptococcus thermophilus</i>	NNAGAA

N= Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin

Y= Cytosin oder Thymin

R= Guanin oder Adenin

7.2. Anhang II - Methoden

Interviewleitfaden

Erzählaufforderungen/Hauptfragen

1. Wie beurteilen Sie aus landwirtschaftlicher Sicht den aktuellen Stand von CRISPR/Cas9-Produkten weltweit? (10min.)
2. Sehen Sie Unterschiede zwischen CRISPR-Rohstoffen und Rohstoffen aus konventionellem Anbau? (15min.)
3. Wie bewerten Sie die Lebensmittelsicherheit von CRISPR-Produkten? (15min.)
4. Wie würden Sie CRISPR-Produkte lebensmittelrechtlich einordnen? (5min.)
5. Welche Bedeutung wird die Genom-Editierung von Pflanzen im Lebensmittelsektor künftig einnehmen? (10min.)

Nachfragen/Unterfragen

1. Wie ist der aktuelle Stand?
 - Würden Sie bestätigen, dass CRISPR/Cas9 weitaus effektiver, schneller und kostengünstiger als andere Verfahren ist, um genetische Veränderungen zu erzeugen?
 - Wie würde das CRISPR-Werkzeug zu nachhaltigeren Lebensmittelsystemen beitragen?

- In vielen Ländern (USA, Kanada, Japan, Teile Südamerikas) sind CRISPR-Produkte auf dem Markt. Was könnte die EU von solchen Ländern hinsichtlich standardisierten und geprüften Methoden lernen/übernehmen?
2. Vergleich CRISPR-Produkte vs. landwirtschaftliche Produkte
- Sehen Sie spezielle Vorteile von CRISPR-Rohstoffen?
 - Ggf. Vorteile des Nährwertprofils, der technofunktionellen Eigenschaften, für Endprodukte, die aus CRISPR-Rohstoffen weiterverarbeitet werden?
 - Welchen Hauptvorteil von CRISPR-Rohstoffen sehen Sie jeweils für Landwirtschaft, Verbraucher und Lebensmittelindustrie?
 - Wie bedeutend schätzen Sie die Herstellung von CRISPR-Kartoffeln und Tomaten in der EU ein? (Einschätzung Skala von 1 (wenig bedeutend) bis 10 (überaus bedeutend))
 - Welches CRISPR-Obst bzw. Gemüse sehen Sie ggf. als relevanter/bedeutender für die europäische Landwirtschaft an und wo sehen Sie das meiste Potenzial?
 - Für welche Anwendung eignen sich CRISPR-Produkte mehr? Für die Weiterverarbeitung bis hin zu anderen Endprodukten oder für den direkten, unverarbeiteten Verzehr?
 - Welche Anwendungsbereiche vermuten Sie primär für CRISPR-Kartoffeln und Tomaten? Direkter Verzehr oder Weiterverarbeitung?
 - Fallen Ihnen mögliche Nachteile/negative Auswirkungen bei der Weiterverarbeitung von CRISPR-Produkten ein?
 - Könnten gezielt hervorgerufene Eigenschaften während des Weiterverarbeitungsprozesses verloren gehen?
3. Lebensmittelsicherheit und Risikomanagement
- Wie sicher ist die CRISPR/Cas9 Technik (ggf. Vergleich zu anderen Verfahren)?
 - Gibt es explizite Risiken?
 - Würden Prime Editing und CRISPR/Switch jegliche Risiken beseitigen?
 - Ist eine Risikoprüfung von genomeditierten Pflanzen in der EU notwendig? Wie würden Sie hinsichtlich Planung und Durchführung vorgehen?
 - Welche Elemente einer Risikoprüfung müssten Ihrer Meinung nach vorliegen, um Natur/Umwelt sowie die Gesundheit von Mensch und Tier zu schützen?
 - Was halten Sie von der Einführung einer Art Zulassungsbezeichnung, wie GRAS (Generally Recognized As Safe) in den USA, für den Beweis der Sicherheit von CRISPR-Produkten in der EU? Würde GRAS als Risikoprüfung ausreichen?

- Gäbe es für das Qualitätsmanagement (QM) in der Lebensmittelproduktion Maßnahmen/Faktoren, die im Umgang mit CRISPR-Produkten im QM etabliert werden sollten?
- Was wären mögliche Herausforderungen im QM für genomeditierte Pflanzen vs. konventionell angebauten Pflanzen?
- Macht ein HACCP Konzept Sinn? Welche CCPs wären bei CRISPR-Produkten festzulegen?

4. Lebensmittelrecht

- Inwieweit sehen Sie das Urteil des EuGH vom Juli 2018 hinsichtlich der Gleichstellung von genomeditierten Pflanzen mit GV-Pflanzen gerechtfertigt?
- Wie würden Sie genomeditierte Pflanzen lebensmittelrechtlich einordnen?
 - Ggf. Novel Food oder eigene Kategorie?

5. Bedeutung Genom-Editierung

- Wie würden Sie die Zukunft von CRISPR-Produkten in der europäischen Lebensmittelindustrie prognostizieren? Welche Chancen sehen Sie für die Anwendung von CRISPR/Cas9 in der EU?
- Werden CRISPR-Produkte an Bedeutung gewinnen zum Beispiel hinsichtlich Lebensmittelindustrie/Lebensmittelsystemen/lebensmittelverarbeitenden Betrieben?
- Welche wirtschaftlichen Möglichkeiten bietet CRISPR/Cas9 dem europäischen Markt und welche Lebensmittelgruppen würden primär profitieren?



Einverständniserklärung für die Durchführung und Auswertung eines Experteninterviews im Rahmen einer Masterarbeit

Eckdaten

Titel der Masterarbeit: Anwendung von CRISPR/Cas9 bei landwirtschaftlichen Nutzpflanzen und Obstkulturen am Beispiel von Kartoffeln und Tomaten

Name der Universität: Hochschule für Angewandte Wissenschaften (HAW Hamburg)

Name der Forschenden: Laura Katharina Beer

Datum der Interview Durchführung: 25.01.2023 von 10:00h bis 11:00h

Informationen zur Durchführung

Das Experteninterview findet über Zoom statt. Den Einladungslink erhalten Sie im Vorfeld, sodass Sie dem Zoom Raum problemlos beitreten können. Nach der Begrüßung wird Ihr Einverständnis für die Aufzeichnung des Interviews, zusätzlich zu der vorliegenden schriftlichen Einwilligungserklärung, mündlich eingeholt. Sie werden darüber informiert, dass Sie das Einverständnis für die Teilnahme jederzeit widerrufen können. Anschließend starten wir mit dem Interview.

Datenschutz

Das Aufzeichnen des Interviews dient zur Erstellung des Transkripts. Die Weiterverarbeitung der Audiodatei des Interviews erfolgt durch eine Transkriptionssoftware. Nach Verschriftlichung des Interviews sowie der Freigabe durch den Interviewten wird die Audiodatei umgehend gelöscht. Bei den erhobenen Daten handelt es sich ausschließlich um die beantworteten Interviewfragen, die einmalig und allein für diese Masterarbeit verwendet werden dürfen. Es ist vorgesehen die Interviewteilnehmer namentlich zu erwähnen. Bitte erteilen Sie Ihr Einverständnis/Widerspruch durch Ankreuzen des entsprechenden Kästchens.

Ich bin damit einverstanden namentlich erwähnt zu werden.



Ich bin nicht damit einverstanden namentlich erwähnt zu werden.



In diesem Fall werden die persönlichen Teilnehmerinformationen anonymisiert.

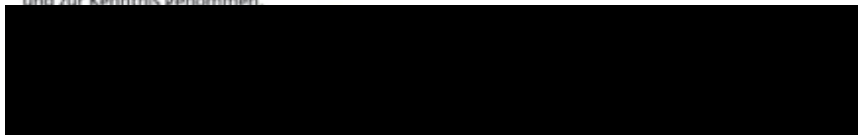
Einwilligungserklärung:

Hiermit erkläre ich mich dazu bereit, an einem Interview zu dem oben genannten Titel teilzunehmen. Ich versichere, dass meine Interviewteilnahme und die Zustimmung zur Verwendung der Daten freiwillig erfolgen. Es besteht jederzeit die Möglichkeit meine Zustimmung zu widerrufen.

Ich habe ein Recht auf Auskunft, Berichtigung und Löschung sowie auf die Einschränkung der Verarbeitung. Ich kann Widerspruch hinsichtlich der Verwendung meiner personenbezogenen Daten einreichen.

Unter diesen genannten Bedingungen erkläre ich mich bereit, das Interview zu geben und stimme der Aufzeichnung, Verschriftlichung sowie der Auswertung der Interviewdaten zu.

Darüberhinaus habe ich die in dieser Einverständniserklärung aufgeführten Informationen gelesen und zur Kenntnis genommen.



Ort, Datum, Unterschrift Interviewpartner_in

Ort, Datum, Unterschrift Interviewer_in

Einverständniserklärung für die Durchführung und Auswertung eines Experteninterviews im Rahmen einer Masterarbeit

Eckdaten

Titel der Masterarbeit: Anwendung von CRISPR/Cas9 bei landwirtschaftlichen Nutzpflanzen und Obstkulturen am Beispiel von Kartoffeln und Tomaten

Name der Universität: Hochschule für Angewandte Wissenschaften (HAW Hamburg)

Name der Forschenden: Laura Katharina Beer

Datum der Interview Durchführung: 30.01.2023 von 11:30h bis 12:30h

Informationen zur Durchführung

Das Experteninterview findet über Zoom statt. Den Einladungslink erhalten Sie im Vorfeld, sodass Sie dem Zoom Raum problemlos beitreten können. Nach der Begrüßung und vor Beginn des Interviews wird Ihr Einverständnis für die Aufzeichnung des Interviews, zusätzlich zu der vorliegenden schriftlichen Einwilligungserklärung, mündlich eingeholt. Sie werden darüber informiert, dass Sie das Einverständnis für die Teilnahme jederzeit widerrufen können. Anschließend starten wir mit dem Interview.

Datenschutz

Das Aufzeichnen des Interviews dient zur Erstellung des Transkripts. Die Weiterverarbeitung der Audiodatei des Interviews erfolgt durch eine Transkriptionssoftware. Nach Verschriftlichung des Interviews sowie der Freigabe durch den Interviewten wird die Audiodatei umgehend gelöscht. Bei den erhobenen Daten handelt es sich ausschließlich um die beantworteten Interviewfragen, die einmalig und allein für diese Masterarbeit verwendet werden dürfen. Es ist vorgesehen die Interviewteilnehmer namentlich zu erwähnen. Bitte erteilen Sie ihr Einverständnis/Widerspruch durch Ankreuzen des entsprechenden Kästchens.

Ich bin damit einverstanden namentlich erwähnt zu werden.

Ich bin nicht damit einverstanden namentlich erwähnt zu werden.

In diesem Fall werden die persönlichen Teilnehmerinformationen anonymisiert.

Einverständniserklärung für die Durchführung und Auswertung eines Experteninterviews im Rahmen einer Masterarbeit

Eckdaten

Titel der Masterarbeit: Anwendung von CRISPR/Cas9 bei landwirtschaftlichen Nutzpflanzen und Obstkulturen am Beispiel von Kartoffeln und Tomaten

Name der Universität: Hochschule für Angewandte Wissenschaften (HAW Hamburg)

Name der Forschenden: Laura Katharina Beer

Datum der Interview Durchführung: 16.01.2023 von 10:00h bis 11:00h

Informationen zur Durchführung

Das Experteninterview findet über Zoom statt. Den Einladungslink erhalten Sie im Vorfeld, sodass Sie dem Zoom Raum problemlos beitreten können. Nach der Begrüßung wird Ihr Einverständnis für die Aufzeichnung des Interviews, zusätzlich zu der vorliegenden schriftlichen Einwilligungserklärung, mündlich eingeholt. Sie werden darüber informiert, dass Sie das Einverständnis für die Teilnahme jederzeit widerrufen können. Anschließend starten wir mit dem Interview.

Datenschutz

Das Aufzeichnen des Interviews dient zur Erstellung des Transkripts. Die Weiterverarbeitung der Audiodatei des Interviews erfolgt durch eine Transkriptionssoftware. Nach Verschriftlichung des Interviews sowie der Freigabe durch den Interviewten wird die Audiodatei umgehend gelöscht. Bei den erhobenen Daten handelt es sich ausschließlich um die beantworteten Interviewfragen, die einmalig und allein für diese Masterarbeit verwendet werden dürfen. Es ist vorgesehen die Interviewteilnehmer namentlich zu erwähnen. Bitte erteilen Sie Ihr Einverständnis/Widerspruch durch Ankreuzen des entsprechenden Kästchens.

Ich bin damit einverstanden namentlich erwähnt zu werden.

Ich bin nicht damit einverstanden namentlich erwähnt zu werden.

In diesem Fall werden die persönlichen Teilnehmerinformationen anonymisiert.

Einwilligungserklärung:

Hiermit erkläre ich mich dazu bereit, an einem Interview zu dem oben genannten Titel teilzunehmen. Ich versichere, dass meine Interviewteilnahme und die Zustimmung zur Verwendung der Daten freiwillig erfolgen. Es besteht jederzeit die Möglichkeit meine Zustimmung zu widerrufen.

Ich habe ein Recht auf Auskunft, Berichtigung und Löschung sowie auf die Einschränkung der Verarbeitung. Ich kann Widerspruch hinsichtlich der Verwendung meiner personenbezogenen Daten einreichen.

Unter diesen genannten Bedingungen erkläre ich mich bereit, das Interview zu geben und stimme der Aufzeichnung, Verschriftlichung sowie der Auswertung der Interviewdaten zu.

Darüberhinaus habe ich die in dieser Einverständniserklärung aufgeführten Informationen gelesen und zur Kenntnis genommen.

Münster, 17.01.23

Ort, Datum, Unterschrift Interviewpartner_in

Ort, Datum, Unterschrift Interviewer_in

Entwicklung der Kategorienbildung

Zuordnung 1

Im ersten Durchlauf entstanden insgesamt 26 Kategorien, die sich wie folgt auf die im Interviewleitfaden festgelegten 5 Hauptkategorien aufteilen:

1. Hauptfrage des Interviewleitfaden: Aktueller Stand

Elf Kategorien
Definition
Einschätzung des Potenzials
Gesellschaftliche Akzeptanz
Klimakrise
Anwendungsbeispiele
Funktionsweise
Entwicklung der Methode
Abgrenzung Züchtungsmethode
Nachhaltige Lebensmittelsysteme
Umgang mit Genome Edits außerhalb der EU
Gleichstellung konventioneller Gentechnik & Genome Edits

2. Hauptfrage des Interviews: Gegenüberstellung von CRISPR-RS und Landwirtschaftlichen Produkten

Sechs Kategorien
Vorteile
Bedeutung CRISPR Kartoffel in der EU
Bedeutung CRISPR Tomate in der EU
Relevantes Obst und Gemüse in der EU ggf. raus
Aufklärung von CRISPR/Cas
Direkter Verzehr vs. weiterverarbeitete Produkte

3. Hauptfrage des Interviews: Lebensmittelsicherheit

Vier Kategorien
Risiken
Aufbauende Technologien
Risikoprüfung
CRISPR-Produkte im Lebensmittelbetrieb

4. Hauptfrage: Lebensmittelrecht

Vier Kategorien
Kennzeichnung
(Sorten) Zulassung
Gentechnikgesetz
Politik

5. Hauptfrage: Stellenwert in EU

Eine Kategorie
Bedeutung Genome-Editierung EU

Zuordnung 2

Finale Reihenfolge, der Hauptkategorien, wie sie im Ergebnisteil der Masterarbeit erscheint:

1. Hauptkategorie: Aktueller Stand und zukünftige Bedeutung

Fünf Kategorien
Existierende Methoden
Potenzialeinschätzung der Experten
Gesellschaftliche Akzeptanz
Klima
Optimierte Pflanzeigenschaften durch Ermittlung von Gen-Funktionen

2. Hauptkategorie: Lebensmittelbezogene Anwendungsbeispiele

Fünf Kategorien
CRISPR veränderte Kartoffel
CRISPR-veränderte Tomaten
Vorteile
Direkter Verzehr oder weiterverarbeitete Produkte

3. Hauptkategorie Lebensmittelsicherheit

Vier Kategorien
Allgemein
Risiken
Risikoprüfung
Aufbauende Technologien

4. Lebensmittelrechtliche Zuordnung

Sechs Kategorien
Umgang mit Genome Edits außerhalb der EU
Umgang mit Genome Edits innerhalb der EU
Kennzeichnung
Zulassung

7.3. Anhang III - Ergebnisse

Interviewtranskripte

Dr. Jochen Kumlehn

[Masterarbeit_Laura_Katharina_Beer/Interviewtranskripte/Transkript_Kumlehn.pdf](#)

Dr. Detlef Weigel

[Masterarbeit_Laura_Katharina_Beer/Interviewtranskripte/Transkript_Weigel.pdf](#)

Dr. Stefan Weini

[Masterarbeit_Laura_Katharina_Beer/Interviewtranskripte/Transkript_Weini.pdf](#)

Eidesstattliche Erklärung

Fakultät Life Sciences
Prüfungsausschuss



Eidesstattliche Erklärung und Veröffentlichungserklärung Student oder Studentin

Anwendung von CRISPR/Cas bei landwirtschaftlichen Nutzpflanzen und Obstkulturen am Beispiel von Kartoffeln und Tomaten

Eidesstattliche Erklärung Student oder Studentin

verfasst von: Frau **Beer** Laura Katharina

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Master Thesis mit dem o.a. formulierten Thema ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.
Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Datum: 16.08.23

Laura Katharina Beer

Erklärung zur Veröffentlichung des Studenten oder der Studentin

Ich bin mit der Online-Veröffentlichung der oben genannten Abschlussarbeit auf dem Dokumentenserver der HAW Hamburg **nicht einverstanden**.

Mit meiner Unterschrift bestätige ich obige Angaben und dass ich die Richtlinien zur Veröffentlichung von Abschlussarbeiten der HAW Hamburg zur Kenntnis genommen habe und akzeptiere. Zu finden im Downloadbereich Fakultätsservicebüro Life Sciences, dort unter den Downloads des jeweiligen Studiengangs.

Datum: 16.08.23

Unterschrift:

Laura Katharina Beer

Bei der Abgabe der Master Thesis abzugeben

Beer, Laura Katharina;

225 31 80

Prüfung_Abschlussarbeit_alle Studiengänge_S.2
Food Science Master 20182 vers. 02.20