



www.efbs.admin.ch



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Swiss Confederation

Eidgenössische Fachkommission für biologische Sicherheit EFBS
Commission fédérale d'experts pour la sécurité biologique CFSB
Commissione federale per la sicurezza biologica CFSB
Cumissiuun federala per la segirezza biologica CFSB

Swiss Expert Committee for Biosafety SECB

CH-3003 Bern
EFBS

POST CH AG

Bernadette Guenot
Sektion Biotechnologie
Bundesamt für Umwelt
3003 Bern

Aktenzeichen: BAFU-622.5-64856/9

Geschäftsfall:

Ihr Zeichen:

Bern, 6. Dezember 2023

Gesuch B23002: Freisetzungversuch mit gentechnisch veränderten Gerstenlinien mit erhöhtem Ertragspotential

Stellungnahme der EFBS

Sehr geehrte Frau Guenot, liebe Bernadette

Sehr geehrte Damen und Herren

Die EFBS hat das Gesuch B23002 von Agroscope für einen Freisetzungversuch mit gentechnisch veränderten Gerstenlinien, die ein erhöhtes Ertragspotential haben, am 17. Oktober 2023 zur Stellungnahme erhalten und an ihren Sitzungen vom 26. Oktober und 6. Dezember 2023 besprochen.

Ausgangslage

Agroscope beantragt die Durchführung eines Freisetzungversuchs mit gentechnisch veränderten Linien der Sommergerstensorte Golden Promise, die Mutationen in den Genen *HvCKX2.1* und *HvCKX2.2* tragen. Diese Gene codieren für die Enzyme Cytokinin-Oxidase/Dehydrogenase, die in den Ähren Cytokinin abbauen. Die Gesuchsteller möchten untersuchen, welche Rolle diese Gene bei der Regulation des Samenertrags spielen.

In diesem Freisetzungversuch sollen erstmals in der Schweiz Pflanzen freigesetzt werden, die mittels neuer gentechnischer Verfahren hergestellt worden sind: zur gezielten Mutagenese der beiden Gene *HvCKX2.1* und *HvCKX2.2* wurde CRISPR/Cas9 verwendet. Das entsprechende CRISPR/Cas9-Konstrukt wurde via *Agrobacterium tumefaciens* in die Zellen der Empfängerpflanzen eingebracht und dort

Eidgenössische Fachkommission für biologische Sicherheit
Monbijoustrasse 40, 3003 Bern
Tel.: +41 58 62 052 38 / Tel. +41 58 46 323 12
info@efbs.admin.ch
www.efbs.admin.ch



BAFU-A-D7B33401/33

in das Pflanzengenom integriert. In den transformierten Pflanzenzellen werden anschliessend das Cas9-Enzym und vier verschiedene guideRNAs (gRNA) hergestellt: Cas9 codiert für eine Endonuklease, während die gRNAs komplementär zu ausgewählten Sequenzen der Zielgene sind und dadurch Cas9 an die gewünschte Stelle im Genom bringen, wo ein Doppelstrangbruch eingeführt wird, der durch zelleigene Enzyme repariert wird. Da diese Reparatur oft ungenau erfolgt, kommt es in den Zielgenen zu Mutationen: Insertionen oder Deletionen von einer unterschiedlichen Anzahl von Nukleotiden / Basenpaaren. Ziel dieser Mutationen ist im konkreten Fall, die beiden Zielgene auszuschalten, also eine *loss-of-function*-Mutation zu erhalten, die es ermöglicht, die Funktion der Gene zu untersuchen. Es wird vermutet, dass durch die Inaktivierung der beiden Gene der Cytokinin-Abbau in den Ähren reduziert wird, was die Ährchenbildung verlängern und somit den Ertrag erhöhen könnte.

Im Freiland sollen 9 mutante Gerstenlinien getestet werden:

- 2 *HvCKX2.1* Einzelmutanten
- 4 *HvCKX2.2* Einzelmutanten
- 3 *HvCKX2.1/HvCKX2.2* Doppelmutanten

Als Kontrollen werden zwei Golden Promise-Linie nach Gewebekultur (*in vitro*-Kontrollen, die nicht mutiert worden sind) sowie der Golden Promise Wildtyp verwendet.

Die zur Herstellung der mutanten Linien verwendete T-DNA mit dem CRISPR/Cas9-Genkonstrukt und dem Hygromycin-Resistenzmarker gen wurde durch Segregation eliminiert, so dass die mutanten Gerstenlinien keine artfremde DNA mehr enthalten sollten (siehe auch unten). Das Resistenzmarker gen ist zur Selektion der transformierten Pflanzengewebe notwendig, hat aber danach keine Funktion mehr.

Der Versuch dient primär der Grundlagenforschung zur Ertragsbildung und zur Rolle der Zielgene. Untersucht werden verschiedene Ertragskomponenten unter Freilandbedingungen (Keimrate, Blattchlorophyllgehalt, Blüte, Anzahl Triebe und Ähren / Pflanze, Pflanzenhöhe, Kornertrag pro Parzelle). Diese werden mit den Ergebnissen im Gewächshaus verglichen. Bei den geernteten Pflanzen werden u.a. die Anzahl Körner pro Ähre und das 1000-Korngewicht ermittelt. Weiter sollen die Pflanzen auf Krankheiten und Krankheitserreger hin untersucht und damit auch verschiedene Biosicherheitsfragen beleuchtet werden.

Der Versuch soll von Frühling 2024 bis Herbst 2026 auf der Protected Site stattfinden, wobei u.a. folgende Sicherheitsmassnahmen getroffen werden:

- 2m hoher Doppelzaun, Zutrittsbeschränkung, professionelles Sicherheitspersonal etc.
- Isolationsabstand 60m zu anderen Gerstenfeldern (kommerzieller Anbau, Versuche, Saatgutvermehrung)
- Mantelsaat von 2.6m Breite, andere Sommergerstensorte
- Vogelnetze zum Schutz vor Vogelfrass nach Aussaat und vor Ernte
- Durchwuchskontrolle, in und 12m um die Versuchsfläche
- Reinigung der Maschinen, Geräte, Schuhe etc. vor Verlassen der Versuchsfelder
- Gesicherter Transport und Abfallentsorgung

Überlegungen der EFBS

Auskreuzungspotential

Was das Auskreuzungspotential angeht, so ist Gerste eine der unproblematischsten Getreidearten. Die Selbstbestäubungsrate ist bei Kulturgerste mit 99% allgemein sehr hoch und eine Fremdbefruchtung entsprechend selten. Dies trifft auch auf die Ausgangssorte Golden Promise zu, eine ebenfalls äusserst kleistogam blühende Art. Resultate aus den Versuchen im Gewächshaus bestätigen, dass auch

die mutanten Gerstenlinien kleistogam bleiben und keine Antheren aussen an den Ähren gesehen worden sind (Gesuch Tabelle 10). Mit dem vorgesehenen Isolationsabstand von 60m zu Feldern mit kommerziellem Anbau oder Saatgutvermehrung von Gerste sowie zu Versuchen ist eine Auskreuzung sehr unwahrscheinlich. Dennoch hält es die EFBS für wichtig, dass vor Beginn der Versuche bekannt ist, ob im Umkreis der Protected Site Gerste angebaut wird. Sie empfiehlt, auf eine Saatgutvermehrung zu verzichten, da das Risiko für Auskreuzungen zwar sehr gering ist, aber nicht ganz ausgeschlossen werden kann.

Auskreuzungen auf Wildpflanzenarten sind ebenfalls eher selten, da die meisten wilden Artverwandte mit Gerste geschlechtlich inkompatibel sind. Die in der Schweiz und auch in der Region des Versuchsorts vorkommenden wilden Artverwandten sind *Hordeum murinum* und *Hordeum jubatum*. Kulturgerste kann auf beide Arten kaum spontan auskreuzen und die Erzeugung interspezifischer Hybride benötigt erhebliches menschliches Einwirken. Genfluss und Auskreuzungen auf Wildarten sind aus Sicht der EFBS bei vorliegendem Gesuch daher nicht relevant.

Nachweis der Abwesenheit der T-DNA

Die für die Genomeditierung der Zielgene nötige T-DNA mit den CRISPR/Cas9-Genkonstrukte sowie dem Hygromycin-Resistenzmarker gen ist eine transgene Gensequenz, die nicht mehr benötigt wird, nachdem die Mutationen in den Zielgenen stattgefunden haben, und die daher grundsätzlich unerwünscht ist, weil transgen. Durch Selbstung der Primärtransformanten (TM₀) segregiert die T-DNA nach den Mendelschen Regeln und kann wegselektioniert werden. Nur diejenigen Pflanzen sind weiter vermehrt worden, die keine T-DNA geerbt haben, aber dennoch die gewünschten Mutationen tragen. Mittels PCR wurde gezeigt, dass in den verwendeten 9 mutanten Gerstenlinien weder das Gen für Cas9 noch das für Hygromycin-Resistenzmarker gen vorhanden sind.

Aus Sicht der EFBS besteht die geringe Möglichkeit, dass während des Transformationsprozesses an anderen Stellen des Genoms weitere unvollständige Kopien der T-DNA integriert werden können, die durch die für den PCR-Nachweis verwendeten Primer nicht entdeckt werden. Sie würde es deshalb begrüßen, wenn die Gesuchsteller weitergehende Analysen durchführen, um diese Möglichkeit auszuschliessen: beispielsweise durch eine Sequenzierung des gesamten Genoms der mutierten Gerstenlinien und einem Vergleich mit dem publizierten Genom der Ausgangssorte Golden Promise.

Besonders mit Blick auf die anstehende Neuregulierung von Pflanzen aus neuen gentechnischen Verfahren besteht aus Sicht der EFBS Bedarf nach einheitlichen Detektionsmethoden, um zuverlässig und reproduzierbar nachweisen zu können, dass gewisse Produkte aus neuen gentechnischen Verfahren keine artfremden Gensequenzen erhalten und somit als nicht-transgen gelten. Solche Analysen liefern einen wichtigen Beitrag zur Biosicherheit, und die M1-Nullsegreganten der zur Freisetzung beantragten genomeditierten Gerstenlinien eignen sich für solche Untersuchungen sehr gut. Sollten Fremdsequenzen entdeckt werden, die auf unvollständige Kopien der T-DNA zurückgehen, und die mit der PCR-Analyse vorgängig nicht erfasst worden sind, würden sie kein zusätzliches Risiko darstellen: das oben beschriebene Reproduktionsverhalten von Gerste sowie die verschiedenen Sicherheitsmassnahmen würden das Risiko von Auskreuzungen solcher unbeabsichtigt integrierter Fremdsequenzen weiterhin minimieren.

Relevanz der Untersuchungen zur Biosicherheit

Die Freisetzungsverordnung sieht vor, dass Freisetzungsversuche zur Erforschung der Biosicherheit gentechnisch veränderter Organismen beitragen. Die Gesuchsteller halten daher auch fest, dass ihre Versuche einen Beitrag zur Untersuchung der Biosicherheit liefern und erwähnen die Untersuchung von erwarteten und unerwarteten Effekten. Sie wollen beispielsweise Ertragsparameter und allgemeine agronomische und physiologische Faktoren untersuchen und somit mögliche pleiotrope Effekte feststellen und u.a. prüfen, ob die Blüten kleistogam blühen (was im Gewächshaus gezeigt werden konnte). Auch Krankheitserreger und Krankheiten sollen erfasst werden. Weiter möchten die Gesuchsteller das

Wissen über Unterschiede zwischen Pflanzen erweitern, die im Gewächshaus oder im Freiland wachsen.

Aus Sicht der EFBS ist nicht ganz klar, inwiefern mit diesen Untersuchungen tatsächlich Biosicherheitsfragen geklärt werden und worin genau der Erkenntnisgewinn liegen soll. Daher stellt sich besonders mit Blick auf künftige Versuche mit Pflanzen, die aus neuen gentechnischen Verfahren stammen, die Frage, wie die Anforderung der Freisetzungsverordnung in Zukunft umgesetzt werden soll, dass Versuche einen Beitrag zur Biosicherheit zu leisten haben. Dazu könnten beispielsweise die oben beschriebenen detaillierteren Untersuchungen zur Abwesenheit von artfremden Gensequenzen gehören.

Die EFBS bedauert, dass mit Golden Promise eine Sorte verwendet wird, die kein agronomisches Potential hat und die Versuche ausschliesslich der Grundlagenforschung dienen. Die Ergebnisse im Gewächshaus zeigen für die untersuchten mutanten Gerstenlinien eine grössere Ährenlänge und tendenziell gleich viel oder mehr Körner pro Pflanze, wobei die Unterschiede zu den Kontrollpflanzen nur bei wenigen Linien statistisch signifikant sind. Die Ergebnisse liefern insgesamt wenig Anzeichen dafür, dass die Genomeditorierung und somit das Ausschalten der Gene *HvCKX2.1* und *HvCKX2.2* den Ertrag signifikant steigern würde. Es bleibt abzuwarten, ob im Freiland eine grössere Ertragssteigerung beobachtet wird und ob die Versuchsfläche gross genug ist, um die Beobachtungen aus dem Gewächshaus mit einer statistisch besseren Signifikanz bestätigen oder widerlegen zu können.

Schlussfolgerungen der EFBS

Die EFBS hat generell wenig Sicherheitsbedenken bei diesem Freisetzungsgesuch. Der Versuch findet auf der Protected Site unter Einhaltung der oben aufgeführten Sicherheitsmassnahmen statt. Das Potential für Auskreuzungen und Gentransfer auf andere Kultur- und Wildarten ist sehr gering. Die EFBS hält das Risiko für Mensch, Tier und Umwelt für sehr klein und stimmt dem Freisetzungsversuch zu.

Sie empfiehlt, dass allfällige an die Versuchsfläche angrenzenden Gerstenkulturen nicht als Saatgut verwendet werden sollten. Vor Beginn der Versuche möchte sie den Versuchsplan einsehen, der benachbarte Kulturen enthalten und den Aufbau des Versuchs inkl. Anzahl Pflanzen zeigen sollte.

Weiter empfiehlt sie nachdrücklich, die Gerstenlinien auf molekularer Ebene via Gesamtgenomsequenzierung weiter zu charakterisieren, um auszuschliessen, dass unvollständige oder bruchstückhafte Sequenzen der T-DNA vorhanden sind.

Bitte melden Sie sich, wenn Sie Fragen haben.

Freundliche Grüsse

Für die Eidgenössische Fachkommission für biologische Sicherheit EFBS

Prof. Jacques Schrenzel
Präsident

Dr. Elisabetta Peduzzi
Geschäftsführerin

Julia Link
wissenschaftliche Mitarbeiterin

Elektronische Kopie: Bettina Hitzfeld, Basil Gerber, Christoph Lüthi, Nina Massüger (alle BAFU), Thomas Binz (BAG), Markus Hardegger, Sylvain Aubry (beide BLW), Martin Schrott (BLV), Barbara Wiesendanger, Katja Zerbe (beide AWEL), Ariane Willemsen (EKAH)