

Aktuelle Fragen in der Analytik gentechnisch veränderter Pflanzen

Positionspapier der Arbeitsgruppe Biochemische und molekularbiologische Analytik

Stand: Februar 2025

INHALTSVERZEICHNIS

GRÜNE GENTECHNIK.....	2
Aktuelle Situation gentechnisch veränderter Pflanzen in der EU und weltweit	2
Nachweis von „klassischen“ gentechnisch veränderten Pflanzen: zugelassene GVP	2
Nicht zugelassene GVP und Nulltoleranz	3
Bestimmung des GVP-Anteils	4
Digitale PCR	5
Botanische Verunreinigungen.....	6
NEUE GENOMISCHE TECHNIKEN IN DER PFLANZENZUCHT (GENOME EDITING)	6
Weltweiter Status genomeditierter Pflanzen.....	7
EuGH-Urteil zur rechtlichen Einordnung von Mutageneseverfahren	9
Auswirkungen des EuGH-Urteils auf die analytische Überwachung gentechnisch veränderter Organismen	10
Vorschlag der EU-Kommission zur Neuregelung genomeditierter Pflanzen.....	11
Position der AG „Biochemische und molekularbiologische Analytik“ der GDCh	12
LITERATUR.....	12

GRÜNE GENTECHNIK

Aktuelle Situation gentechnisch veränderter Pflanzen in der EU und weltweit

Bereits seit den 1980er Jahren werden Pflanzen gentechnisch verändert, um neue Eigenschaften wie eine Herbizidtoleranz, Insektenresistenz oder eine veränderte Nährstoffzusammensetzung zu vermitteln. Die mit den Methoden der Grünen Gentechnik hergestellten gentechnisch veränderten Pflanzen (GVP) besitzen in Deutschland und in den meisten Mitgliedsstaaten der Europäischen Union (EU) keine große Akzeptanz. In der EU ist derzeit nur eine GVP für den Anbau nach Richtlinie 2001/18/EG [1] zugelassen, die insektenresistente Maislinie MON810. Der Anbau findet derzeit nur in Spanien und Portugal statt. In vielen anderen Mitgliedsstaaten, darunter Deutschland, ist der Anbau national untersagt.

Weltweit ist die Situation bezüglich des Anbaus etwas differenzierter. Vor allem in Nord- und Südamerika (z. B. USA, Kanada, Argentinien, Brasilien, Paraguay) findet kommerzieller Anbau von GVP im großen Stil statt. Aber auch in Asien, Afrika und Australien werden GVP angebaut. Die **globalen Anbauflächen** haben seit der Kommerzialisierung der GVP im Jahr 1996 deutlich zugenommen und liegen bei über 200 Millionen Hektar [2].

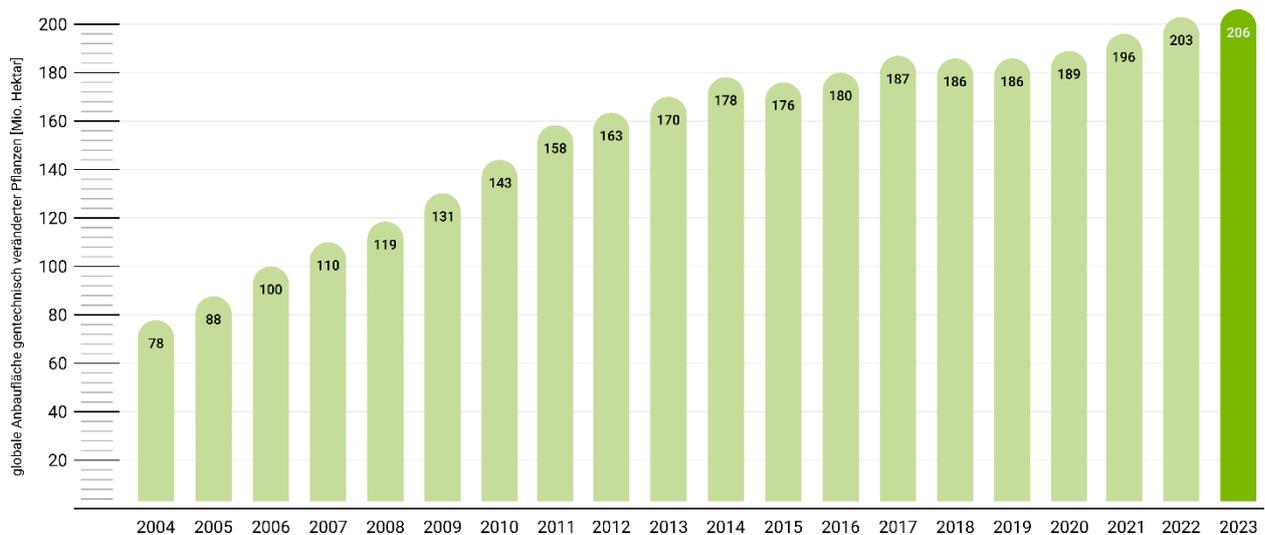


Abbildung 1: Globale Anbauflächen in Mio. Hektar für gentechnisch veränderte Pflanzen von 2004 bis 2023 [2]

Viele dieser weltweit angebauten GVP sind in der EU zur Verwendung als Lebens- und Futtermittel nach den Verordnungen 1829/2003 [3] und 1830/2003 [4, 5] zugelassen. Produkte, die aus GVP hergestellt werden, die in der EU zugelassen sind, müssen entsprechend gekennzeichnet werden. Eine Kennzeichnung kann unterbleiben, sofern der **GVP-Anteil der einzelnen Lebensmittelzutat $\leq 0,9\%$** beträgt und die Beimengung zufällig oder technisch unvermeidbar ist.

Für nicht zugelassene GVP und daraus gewonnenen Erzeugnissen gilt in der EU die „**Null-Toleranz**“.

Nachweis von „klassischen“ gentechnisch veränderten Pflanzen: zugelassene GVP

Die Verwendung zugelassener GVP und der Kennzeichnung der Produkte obliegt dem Inverkehrbringer und wird im Rahmen der amtlichen Überwachung überprüft. Die Art und Weise

der Probenahme sollte sich an aktuellen Empfehlungen orientieren [6-8]. Die Analytik erfolgt auf DNA-Ebene unter Verwendung der **real-time PCR (qPCR)**, die sich als Standard für qualitative und quantitative Analysen etabliert hat. Mit der wachsenden Verbreitung der **digitalen PCR (dPCR)**; (siehe 1.5) in den Überwachungslaboratorien wird aber auch immer häufiger auf diese neue Generation der PCR gesetzt, die vor allem im Bereich der quantitativen Analysen einige Vorteile bietet [9, 10].

Der generelle analytische Ablauf der GVO-Analytik folgt dabei einer sogenannten Nachweiskaskade (Abbildung 2; [11]): zunächst wird die DNA aus der Probe isoliert und der Isolationserfolg und die Abwesenheit von PCR-Inhibitoren über ein **Spezies-spezifisches Referenzgen** überprüft. Anschließend folgt ein **Screening**, bei dem die Probe auf das Vorhandensein von häufig in GVP eingebrachte Genelemente oder Konstrukte untersucht wird. Das Screening dient auch dazu, die mögliche Anzahl der GVP, auf die spezifisch getestet werden muss, einzugrenzen.

Führt das Screening zu einem positiven Ergebnis, muss die jeweilige GVP noch eindeutig identifiziert werden. Bei der Identifizierung nutzt man eine Besonderheit der klassischen GVP: die Integration der Fremd-DNA (aus Bakterien, Viren oder anderen Pflanzen) in das pflanzliche Genom erfolgt an einer mehr oder weniger zufälligen Stelle im Genom (= Integrationsort). Folglich unterscheiden sich z. B. zwei GVP, bei denen das gleiche DNA-Fragment inseriert wurde, am Integrationsort. Weist man nun den Übergangsbereich vom Pflanzengenom in die inserierte Fremd-DNA nach, so lässt sich eine bestimmte klassische GVP eindeutig identifizieren. Dieser Nachweis wird als **Event-spezifischer Nachweis** bezeichnet und muss vom Hersteller der GVP, zusammen mit geeignetem Referenzmaterial, im Rahmen der Zulassung den Mitgliedsstaaten der EU zur Verfügung gestellt werden. Da immer mehr GVP keine für das Screening geeigneten Elemente enthalten, werden einige dieser Event-spezifischen Nachweise in der Überwachung direkt parallel zum Screening eingesetzt.

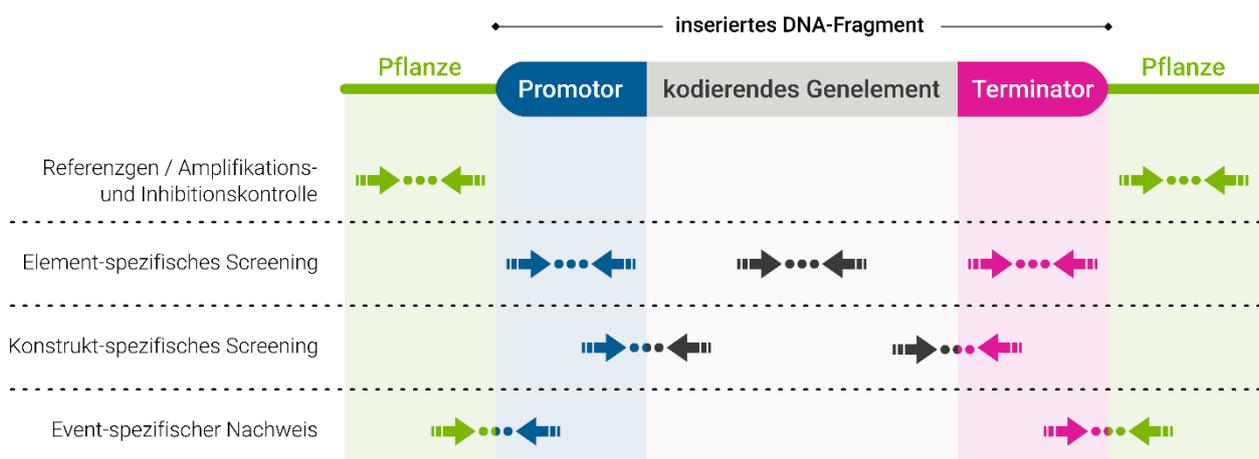


Abbildung 2: Detektionskaskade in der GVO-Analytik

Nicht zugelassene GVP und Nulltoleranz

Sofern kein spezifisches Nachweisverfahren verfügbar ist, wie es häufig bei nicht zugelassenen GVP der Fall ist, sollten positive Screening-Ergebnisse durch den Nachweis weiterer Genelemente/Konstrukte bestätigt und ein Eintrag dieser Genelemente/Konstrukte durch botanische Verunreinigungen mit zugelassenen GVP ausgeschlossen werden.

Wie bereits beschrieben, gilt nach den derzeitigen Gentechnikregularien eine Nulltoleranz gegenüber in der EU nicht zugelassenen GVP. Für diese GVP gibt es folglich auch keine Vorgaben zur Bereitstellung von **Referenzmaterialien** oder **Nachweismethoden** von Seiten der Hersteller. Daher fehlen für diese GVP meist entsprechende Referenzmaterialien und die für die Entwicklung von Event-spezifischen Nachweismethoden notwendigen DNA-Sequenzen der Übergangsbereiche (Pflanzengenom zur inserierten DNA). Für eine Reihe dieser nicht zugelassenen GVP existieren zumindest Konstrukt-spezifische Nachweisverfahren. Sofern es möglich ist, Positivkontrollen über diverse Quellen (z. B. Laborvergleichsuntersuchungen) für diese GVP zu erhalten, können zumindest qualitative Nachweisverfahren etabliert werden.

Angesichts der großen Tragweite positiver Befunde mit Verdacht auf nicht zugelassene GVP sollte höchstmögliche Sorgfalt in die Absicherung solcher Befunde gelegt werden. Dies sei am Beispiel des Nachweises von gentechnisch verändertem Reis erläutert: Für diese Pflanzenart liegt derzeit keine Zulassung von GVP in der EU vor. Im Falle positiver Ergebnisse im Screening und/oder bei gentechnikspezifischen Konstrukten sind jedoch weitere Untersuchungen unerlässlich.

Hiervon ausgenommen sind Einfuhruntersuchungen von Reisprodukten, die aus China stammen und an den Zollimportstellen auf Grundlage des Durchführungsbeschlusses der Europäischen Kommission (2011/884/EU) in der Fassung des Durchführungsbeschlusses (2013/287/EU) zur Änderung des Durchführungsbeschlusses 2011/884/EU erfolgen. Bei diesen Untersuchungen genügt ein positives Ergebnis für mindestens eines der Screening-Elemente *P-35S*, *T-nos* oder *cry1Ab/Ac* als Nachweis der Nicht-Konformität.

Auch ist grundsätzlich der Nachweis von gentechnisch verändertem Reis allein durch Konstrukt-spezifische Nachweisverfahren (z. B. *P-35S-bar*) ausreichend, insbesondere wenn ein Event-spezifisches Verfahren nicht verfügbar ist. Allerdings sollten in diesem Fall auch sogenannte botanische Verunreinigungen aus anderen Pflanzenspezies (siehe auch 1.6), die das nachgewiesene Konstrukt enthalten, berücksichtigt werden. Es sollte zumindest ausgeschlossen werden, dass ein positiver Nachweis auf eine Verunreinigung mit einer zugelassenen GVP zurückzuführen ist. Im Falle des *P-35S-bar*-Konstrukts in Reis sollten insbesondere Baumwolle bzw. die zugelassenen gentechnisch veränderten Baumwoll-Events LL25 sowie T304-40 ausgeschlossen werden. Das Konstrukt *P-35S-bar* ist auch in gentechnisch verändertem Mais, Reis, Soja und weiteren Baumwoll-Events enthalten, allerdings ist keines dieser Events derzeit in der EU zugelassen [5]. Insofern könnte beim Nachweis des *P-35S-bar*-Konstruktes und weiterer hier relevanter Spezies wie Mais oder Soja bei gleichzeitigem Ausschluss der genannten Baumwoll-Events zumindest belegt werden, dass Bestandteile einer nicht zugelassenen gentechnisch veränderten Pflanze enthalten sind.

Zur Art und Weise der Probenahme sollten die Empfehlungen des ALS berücksichtigt werden [7]. Die Ergebnisse aus demselben Probenhomogenat müssen **reproduzierbar** sein und sollten durch eine in Abhängigkeit vom ungefähren GVO-Anteil ausreichend große Zahl an Wiederholungsmessungen (z. B. mindestens 4 Extrakten bei Gehalten nahe der analytischen Nachweisgrenze) mit jeweils positivem Resultat belegt werden.

Bestimmung des GVP-Anteils

Wenn zur Verwendung als Lebens- und/oder Futtermittel zugelassene GVP in einem Produkt detektiert werden und keine Kennzeichnung auf dem Produkt vorhanden ist, muss der GVP-Anteil

quantitativ mittels qPCR bzw. dPCR bestimmt werden. Als Schwellenwert für eine Kennzeichnungspflicht ist in der EU ein GVP-Anteil von 0,9 % vorgegeben [3]. Für die amtliche Kontrolle soll dieser Schwellenwert in Massenprozent angegeben werden [12].

Für die quantitative Bestimmung des GVP-Anteils werden zwei Analysen durchgeführt: a) die Vervielfältigung und Quantifizierung einer DNA-Sequenz, die spezifisch für die Spezies ist, die untersucht wird (Referenzgen); und b) die Bestimmung der im selben DNA-Extrakt vorhandenen Menge an gentechnisch veränderten Bestandteilen.

Die gemessenen DNA-Kopien der gentechnisch veränderten Bestandteile und des Referenzgens werden dann ins Verhältnis gesetzt (= relative Quantifizierung).

$$\text{relativer GVP-Anteil [\%]} = \frac{\text{DNA-Kopien}_{\text{gentechnisch veränderte Bestandteile}}}{\text{DNA-Kopien}_{\text{Pflanzenspezies/Referenzgen}}} \times 100 \quad (1)$$

Um die gentechnische Veränderung quantitativ zu bestimmen, sind sowohl für das pflanzenspezifische Referenzgen, als auch für die GVP entsprechende Referenzmaterialien mit bekannter Ausgangskonzentration notwendig. Die verfügbaren Referenzmaterialien/Standards zertifizieren nicht DNA-Kopienzahlen, sondern Gewichtsanteile von GVO [m/m %] oder stellen Blatt-DNA-Extrakte aus den „reinen“ GVP („100 % GVP“) dar. DNA-Extrakte aus solchen m/m % zertifizierten Materialien bzw. Blatt-DNA wird verwendet, um serielle Verdünnungsreihen herzustellen. Die für die Standardreihe zugrunde gelegten DNA-Kopienzahlen können hierbei auf Basis der Genomäquivalente (anhand des haploiden Genomgewichts) für die Zielsequenz abgeschätzt werden. Hierbei sind die möglichen Unterschiede im Ploidiegrad und der Zygotie des verwendeten Referenzmaterials zu berücksichtigen [13].

Standardreihen werden zusammen mit der zu quantifizierenden Probe gemessen und anhand der Messwerte der Verdünnungsreihe jeweils eine Standardgerade erstellt. Die jeweilige DNA-Kopienzahl der Probe wird über die Geradengleichung der Standardgerade berechnet. Wenn zur Kalibrierung ein in m/m % zertifiziertes Referenzmaterial verwendet wurde, erfolgt die Ergebnisangabe der Probe ebenfalls in m/m %.

Diese Methodik ist nach wie vor der Goldstandard bei der Quantifizierung des GVP-Anteils in einer Probe, bringt jedoch auch ein paar Probleme mit sich. Zum einen sind Referenzmaterialien notwendig, die bei jeder Quantifizierung mitgeführt werden müssen. Diese sind nicht für alle GVP vorhanden. Zudem unterscheiden sich diese Materialien im Verarbeitungsgrad und der Matrix oftmals vom zu quantifizierenden Probenmaterial. Folglich ist davon auszugehen, dass die qPCR-Effizienz bei Proben (vor allem bei hoch prozessierten Proben) schlechter ist, als bei Referenzmaterialien. Die Effizienz der Vervielfältigung ist einer der größten Einflussfaktoren auf das Messergebnis in der qPCR. Vor allem matrix- oder extraktionsbedingte PCR-Inhibitoren sind maßgebliche Störfaktoren in der qPCR, die das Messergebnis erheblich beeinflussen können. Da das zu verwendende Referenzmaterial im Rahmen der Zulassung für jede GVP festgelegt wird, dient das Referenzmaterial als Anknüpfungspunkt für die Quantifizierung und ermöglicht so eine Harmonisierung der Analyseergebnisse.

Digitale PCR

Eine Möglichkeit, den negativen Einflussfaktoren der qPCR zu begegnen, ist die Nutzung der **digitalen PCR (dPCR)**. Die sogenannte dritte Generation der PCR wird seit einigen Jahren auch

in der GVO-Analytik zur Quantifizierung des GVP-Anteils eingesetzt [9]. Bei der dPCR wird der Reaktionsansatz der PCR auf viele Kompartimente aufgeteilt, in denen jeweils separate PCR-Reaktionen ablaufen. Anschließend werden die Kompartimente gezählt und das Verhältnis aus positiven zur Gesamtheit aller Kompartimente gebildet. Unter Einbeziehung der Poisson-Korrektur kann dann die Ausgangskonzentration des Probenmaterials bestimmt werden [14, 15]. Der Vorteil dieser Technik ist, dass die PCR nur so effizient ablaufen muss, dass man positive von negativen Kompartimenten eindeutig unterscheiden kann. Das bedeutet, dass die PCR-Effizienz bei der dPCR einen deutlich geringeren Einfluss auf das Messergebnis hat als bei der qPCR. Das Aufteilen des Reaktionsmix auf einzelne Kompartimente führt außerdem zu einer Aufkonzentrierung der nachzuweisenden DNA pro Kompartiment [16]. Die Quantifizierung erfolgt ohne die Verwendung von externen Standards und damit innerhalb der Probe selbst, so dass auch der Einfluss des Unterschieds von Proben- zu Referenzmaterial auf die Quantifizierung wegfällt.

Mittlerweile wurden für nahezu alle kommerziell verfügbaren Referenzmaterialien sogenannte conversion factors ermittelt, die eine Umrechnung der mittels dPCR bestimmten DNA-Kopienzahlen-Verhältnisse in m/m % erlauben [17]. Zudem hat das BVL Leitlinien zur Verifizierung von Methoden mittels digitaler PCR der § 64 LFGB Arbeitsgruppe GVO veröffentlicht [18]. Damit sollte eine Umstellung der Methoden des European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EURL GMFF) erleichtert werden.

Botanische Verunreinigungen

Bestandteile von GVP können auch als botanische Verunreinigungen oder Fremdbesatz in Lebens- und Futtermittel gelangen. Im Lebensmittelrecht sind keine expliziten Höchstwerte für Verunreinigungen beispielsweise von Ölsaaten durch Saaten anderer Pflanzenarten festgelegt. Jedoch wird bei Ölsaaten oder -früchten eine botanische Verunreinigung von maximal 0,5 %, die aus einem vorangegangenen Herstellungsverfahren stammen, toleriert [19]. Aus dem Futtermittelbereich ist die Anforderung einer Reinheit von 95 % gemäß Artikel 26 Abs. 3 und Anhang I der EU-Futtermittelverordnung Nr. 767/2009 bekannt. Botanische Verunreinigungen fallen in den Geltungsbereich der Verordnungen 1829/2003 und 1830/2003. Lebensmittel oder Lebensmittelzutaten mit Anteilen von in der EU nicht zugelassenen GVO auch aus botanischen Verunreinigungen dürfen daher nicht in den Verkehr gebracht werden [20].

Liegen Anhaltspunkte auf „artfremde“ Bestandteile einer zugelassenen GVP vor, ist zunächst zu prüfen, ob ggf. eine nicht deklarierte Zutat vorliegt. Falls dies auszuschließen ist, greift auch bei botanischen Verunreinigungen die Ausnahmeregelung von der Kennzeichnungspflicht für zufällige oder technisch unvermeidbare Verunreinigungen. Hierfür muss eine quantitative oder zumindest halbquantitative Bestimmung der jeweiligen Pflanzenart durchgeführt werden. Beträgt der Anteil der Spezies, die GV Anteile enthält, weniger als 0,1 %, ist generell davon auszugehen, dass die Verunreinigung zufällig oder technisch unvermeidbar ist [20].

NEUE GENOMISCHE TECHNIKEN IN DER PFLANZENZUCHT (GENOME EDITING)

Bei der „klassischen“ Grünen Gentechnik lässt sich die Position der genetischen Modifikation im pflanzlichen Genom nicht vordefinieren. Darin unterscheidet sich diese Technik von den **neuen genomischen Techniken (NGT)**, die auch unter dem Begriff ‚Genome Editing‘ zusammengefasst werden. Mit Methoden wie z. B. ZFN (Zinkfinger nukleasen), TALEN

(transcription activator-like effector nuclease) oder dem CRISPR/Cas-System kann die Stelle im Genom, an der eine genetische Veränderung induziert werden soll, präzise vorherbestimmt werden. Abhängig davon, wie die Veränderungen und welche Veränderungen erzeugt werden sollen, können diese Techniken in SDN-1, SDN-2 oder SDN-3 eingeteilt werden (SDN = site-directed nuclease; Abbildung 3) [21].

Bei der **SDN-1-Technik** wird die Nuklease gezielt an eine vorher definierte Position im Pflanzengenom gelenkt, an der die Modifikation der DNA erfolgen soll. Dort wird ein DNA-Doppelstrangbruch erzeugt und anschließend vom zelleigenen Reparaturmechanismus repariert. In der Regel wird dieser Doppelstrangbruch fehlerfrei repariert. Es kommt jedoch auch vor, dass einzelne Nukleotide ersetzt (Basenaustausch), hinzugefügt (Insertion) oder entfernt (Deletion) werden. Der Effekt ist meist das Abschalten der Funktion des modifizierten Gens.

Bei der **SDN-2-Technik** erfolgt ebenfalls ein Doppelstrangbruch wie bei der SDN-1-Technik, allerdings wird zusätzlich ein Oligonukleotid zugegeben, das sich von der zu modifizierenden DNA nur in einem oder wenigen Nukleotiden unterscheidet. Der zelleigene Reparaturmechanismus nimmt diese zugegebene DNA als Vorlage für die Reparatur des Doppelstrangbruchs und fügt dadurch auch die kleine Veränderung in das Pflanzengenom ein.

Die **SDN-3-Technik** entspricht dem Vorgehen der SDN-2-Technik. Allerdings wird hier eine Fremd-DNA (im Fall von Cisgenese eine artidentische DNA) hinzugegeben, die als Vorlage für die Reparatur dient und an der Position des Doppelstrangbruchs eingefügt werden soll. Die Ergebnisse der SDN-3-Technik unterscheiden sich von den Ergebnissen der „klassischen“ Grünen Gentechnik dadurch, dass der Einbau der Fremd-DNA an einer nun vordefinierten Position im pflanzlichen Genom erfolgt und nicht mehr zufällig.

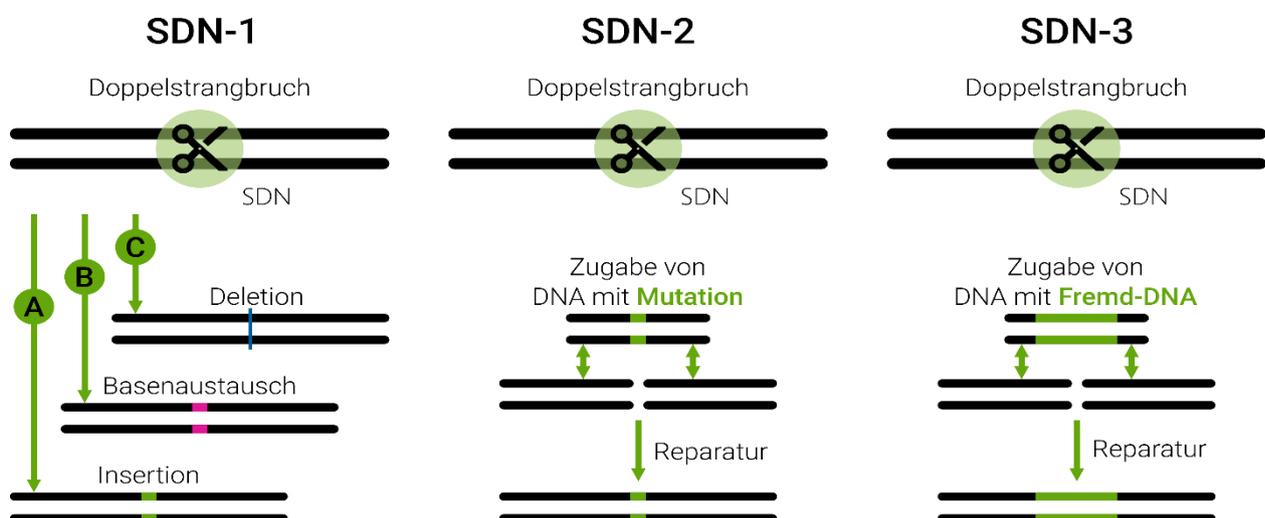


Abbildung 3: Schematische Übersicht der SDN-Techniken und den damit erzeugten genetischen Veränderungen (basiert auf [21]). Bei SDN-1 und SDN-2 werden nur sehr kleine Modifikationen an einer vordefinierten Position im Genom vorgenommen. Bei SDN-3 können auch größere DNA-Fragmente in das Genom an einer vordefinierten Position eingebracht werden.

Weltweiter Status genomeditierter Pflanzen

Die Regulation von genomeditierten Pflanzen wird weltweit sehr unterschiedlich betrachtet (Abbildung 4). In einigen Ländern werden diese Pflanzen, sofern keine Fremd-DNA eingefügt wurde, nicht als GVO eingestuft und daher auch nicht reguliert [22]. Dies betrifft vor allem

Pflanzen, in denen genetische Veränderungen mittels SDN-1- oder SDN-2-Technik erzeugt wurden, da hier nur sehr kleine, gezielte Veränderungen herbeigeführt werden, die auch auf natürliche Art und Weise erzeugt werden könnten. Es handelt sich dabei i. d. R. um kleine Punktmutationen oder Insertionen/Deletionen einzelner Nukleotide.

Die Beurteilung von Organismen, die durch die NGT verändert wurden, kann prozessbezogen oder produktbezogen erfolgen. Bei einer prozessbezogenen Beurteilung spielt ausschließlich die zur genetischen Veränderung verwendete Methode eine Rolle, wohingegen das finale Produkt und die darin enthaltene genetische Veränderung bei der produktbezogenen Beurteilung wichtig sind, unabhängig von der verwendeten Methode.

Die meisten Länder, die bereits eine rechtliche Regelung auf nationaler Ebene implementiert haben, folgen eher einer produktbezogenen Beurteilung [23]. Im Gegensatz dazu folgt die EU eher einer prozessbezogenen Beurteilung [24]. So ist es auch nicht überraschend, dass vor allem in den Ländern mit produktbezogener Beurteilung bereits einige genomeditierte Pflanzen kommerziell angebaut werden.

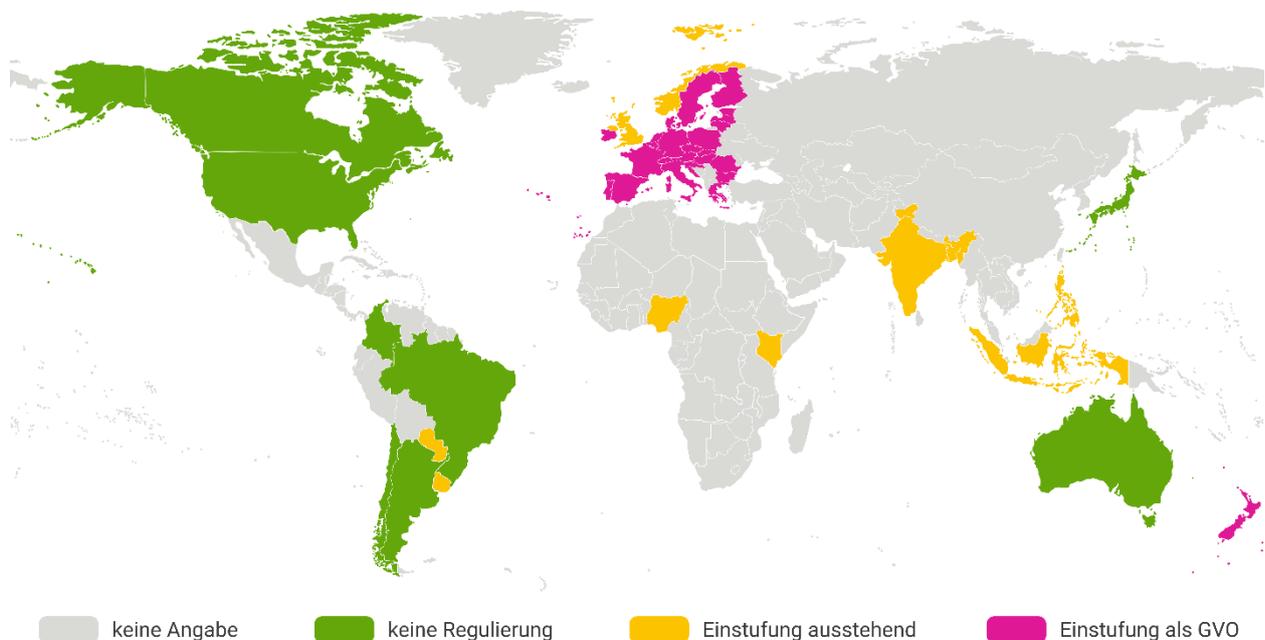


Abbildung 4: weltweiter Regulierungsstatus bezüglich genomeditierter Pflanzen [22]

Die Anwendung neuer genomischer Techniken bei Pflanzen schreitet rasch voran, jedoch sind nur sehr wenige genomeditierte Pflanzen kommerziell erhältlich. Verschiedene Datenbanken sollen einen Überblick über die aktuellen Entwicklungen geben. EU-SAGE (European Sustainable Agriculture Through Genome Editing; [25]) hat eine interaktive Datenbank zu genomeditierten Pflanzen entwickelt (<https://www.eu-sage.eu/genome-search>), die zum einen die aktuellen Anwendungen genomeditierter Nutzpflanzen in den verschiedenen Ländern aufzeigen und zum anderen die Öffentlichkeit, einschließlich der Politik, sachgerecht und verständlich über die Anwendungen informieren soll. Aus den darin enthaltenen Informationen (siehe Abbildung 5) wird deutlich, dass sich die Anwendungsbereiche im Vergleich zur klassischen Gentechnik verschieben. Während bei den klassischen GVO nach wie vor herbizidtolerante und insektenresistente Pflanzen am weitesten verbreitet sind, stehen bei den

genomeditierten Pflanzen zunehmend Toleranzen gegenüber biotischem und abiotischem Stress sowie verbesserte Qualitätseigenschaften im Vordergrund.

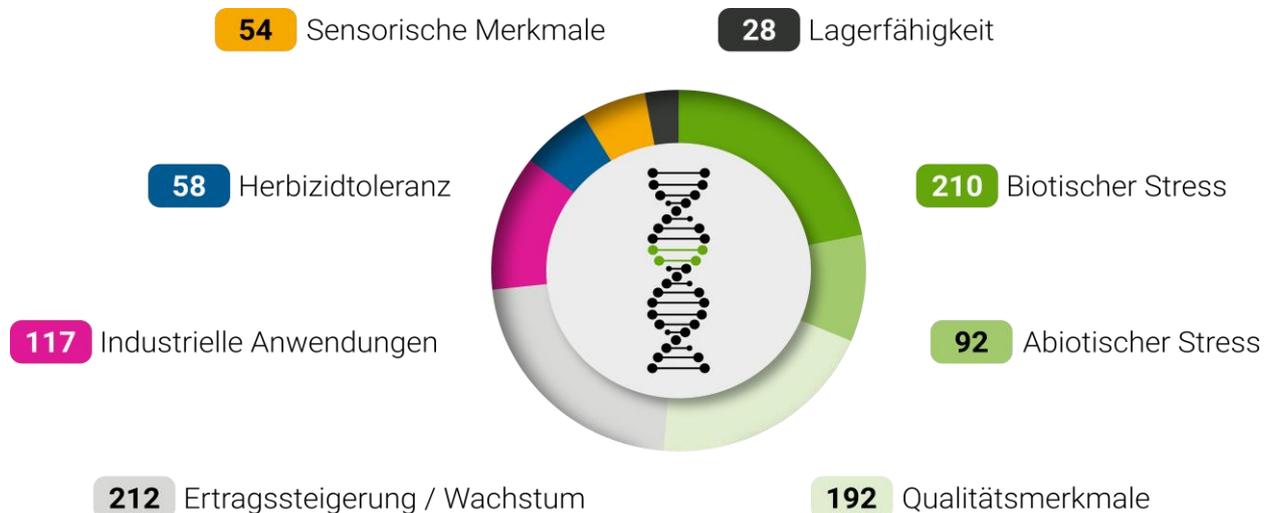


Abbildung 5: Verteilung der Anwendungsbereiche für genomeditierte Pflanzen nach Einträgen in der EU-SAGE-Datenbank. Die Zahlen geben die Anzahl der Einträge in der Datenbank an (Stand: November 2024).

Neben häufig angebauten Nutzpflanzen wie Mais, Soja, Raps und Baumwolle enthält die Datenbank auch Einträge zu genomeditierten Nutzpflanzen wie z. B. Karotte, Melone oder Erdnuss, die einer gentechnischen Veränderung bisher nicht oder nur schwer zugänglich waren. Da die genetischen Veränderungen durch Genome Editing mittels SDN-1 und SDN-2 jedoch nicht von Modifikationen zu unterscheiden sind, die auf natürliche Art und Weise (z. B. durch Sonnenstrahlen) oder durch klassische Mutagenese (radioaktive Strahlung, mutagene Substanzen) entstanden sind, war lange unklar, wie die mittels Genome Editing erzeugten Organismen in der EU rechtlich einzustufen sind. Mit dieser Frage beschäftigte sich der Europäische Gerichtshof (EuGH) ab 2016 [26].

EuGH-Urteil zur rechtlichen Einordnung von Mutageneseverfahren

Im Juli 2018 urteilte der EuGH, dass Organismen, die unter Anwendung von Mutageneseverfahren erzeugt wurden, als gentechnisch veränderte Organismen (GVO) entsprechend der Richtlinie 2001/18/EG zu bewerten sind und damit den Regularien der Gentechnikgesetzgebung unterliegen. Eine Ausnahme gilt für Mutageneseverfahren, die herkömmlich bei einer Reihe von Anwendungen verwendet wurden und seit langem als sicher gelten (z. B. Bestrahlung oder mutagene Substanzen; [27]). Organismen, die mit diesen Techniken hergestellt werden, sind demzufolge von den Regularien der Gentechnikgesetzgebung ausgenommen. Allerdings stellt es der EuGH den EU-Mitgliedsstaaten frei, auch diese Organismen auf nationaler Ebene den in der Richtlinie 2001/18/EG vorgesehenen oder anderen Verpflichtungen zu unterwerfen.

Die Methoden des Genome Editing hingegen wurden nach 2001 entwickelt und sind nicht von den Regularien der Gentechnikgesetzgebung ausgenommen. Das bedeutet, dass Pflanzen, die mittels Genome Editing genetisch verändert wurden, in der EU als GMO eingestuft werden. Diese müssen daher in einem aufwendigen und teuren Prozess zugelassen und Produkte entsprechend

der Verordnungen 1829/2003 und 1830/2003 gekennzeichnet werden [1, 3, 4]. Nicht zugelassene genomeditierte Organismen dürfen nicht auf den EU-Markt gebracht werden.

Auswirkungen des EuGH-Urteils auf die analytische Überwachung gentechnisch veränderter Organismen

Das EuGH-Urteil stellt die Überwachungsbehörden vor die große Herausforderung, die analytische Überwachung der Nutzung von genomeditierten Pflanzen in der EU zu gewährleisten. Hierfür muss nicht nur die genetische Modifikation eindeutig nachgewiesen werden, sondern auch die für die Erzeugung dieser Modifikation verwendete Technik, sofern diese genetischen Modifikationen auch auf natürliche Weise entstehen könnten. Derzeit laufen in der EU keine Zulassungsverfahren für mit Genome Editing (SDN-1 und SDN-2) hergestellte GVP, so dass spezifische Nachweisverfahren für weltweit bereits kommerziell genutzte genomeditierte Organismen derzeit nicht zur Verfügung stehen (Stand: November 2024).

2020 hat die Publikation von Chhalliyil, *et al.* [28] für großes Aufsehen gesorgt, in der eine spezifische qPCR-basierte Methode für die Identifikation und Quantifizierung eines genomeditierten, herbizidtoleranten Rapses der Firma CIBUS vorgestellt wurde. Die Arbeiten wurden durch Organisationen finanziert, die der Gentechnik generell kritisch gegenüberstehen. In diesem genomeditierten Raps basiert die Herbizidtoleranz auf einem Einzelbasenaustausch im *AHAS-1C*-Gen. Der gleiche Einzelbasenaustausch liegt auch im sehr homologen *AHAS-3A*-Gen vor, allerdings nicht nur im CIBUS-Raps, sondern auch im Clearfield-Raps, der nicht mittels NGT hergestellt wurde. Die Autoren beschreiben in ihrer Publikation, dass die Methode direkt in die Routineanalytik eingeführt werden kann und allen Vorgaben der GVO-Analytik [29] entspricht. Dies hat das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) in sehr ausführlichen Analysen untersucht und kam zu dem Ergebnis, dass die Methode in der Tat sehr sensitiv ist, jedoch nicht ausreichend spezifisch und robust [30]. Folglich kann diese Methode nicht als amtliche Methode in der Routineüberwachung von GVP eingesetzt werden.

Das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) förderte von 2021 bis 2023 eine Machbarkeitsstudie zu „Nachweis- und Identifizierungsverfahren für genomeditierte Pflanzen und pflanzliche Produkte“, die am IPK Gatersleben und der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel an Gerste und Raps durchgeführt wurde. In diesem Projekt konnten Nachweismethoden für die eingebrachten Mutationen entwickelt werden. Zur Unterscheidung der genomeditierten Pflanze von der Vergleichslinie wurde der Ansatz verfolgt, weitere Mutationen in räumlicher Nähe zur induzierten Mutation zu nutzen. Solche Mutationen konnten jedoch in keiner der Pflanzen identifiziert werden, so dass in diesem Projekt keine Methoden zur eindeutigen Identifizierung der genomeditierten Pflanzen erarbeitet werden konnten (https://www.ble.de/SharedDocs/Meldungen/DE/2024/240702_genomeditierte_Pflanzen.html).

Auch die Überwachungsbehörden arbeiten derzeit an der Entwicklung von Nachweismethoden für die Detektion von genomeditierten Organismen. Besonders aktiv ist dabei die vom BVL organisierte Arbeitsgruppe **§ 28b GenTG**, die verschiedene molekularbiologische Methoden (qPCR, dPCR, NGS) anwendet, um Mutationen zu detektieren, die mittels Genome Editing in die Pflanze eingebracht wurden. So beschäftigt sich die Arbeitsgruppe mit Nachweismethoden für die Calyno Sojabohne der Firma Calyxt, den Wachsmais der Firma Corteva Agriscience und die GABA-Tomate von der Firma Sanatech Seeds [31].

Das hierfür verwendete Methodenspektrum deckt sich mit den Methoden, die das European Network of GMO Laboratories (ENGL) als geeignet erachtet hat [32, 33]. Ein Problem bei der Entwicklung von Nachweismethoden ist die mangelnde Verfügbarkeit von Referenzmaterial. Solange kein Zulassungsantrag in der EU gestellt wurde, sind Hersteller nicht verpflichtet, **Referenzmaterial** für die jeweilige genomeditierte Pflanze zur Verfügung zu stellen. Folglich fehlen diese Materialien, um entwickelte Nachweismethoden auch mit realen Proben testen und entsprechend der Vorgaben zur GVP-Analytik validieren zu können. Dies ist vor allem deshalb wichtig, da publizierte Sequenzinformationen, die für die Methodenentwicklung verwendet werden, nicht zwangsläufig mit den Sequenzen der kommerzialisierten GVP übereinstimmen. Daher ist es für Kontroll- und Überwachungslabore unerlässlich, auch die praktische Anwendbarkeit der Methoden zu zeigen. Dabei sind sie auf die Kooperationsbereitschaft der Hersteller angewiesen, die jedoch erwartungsgemäß derzeit nur in geringem Ausmaß vorhanden ist. Oft ist aber auch die Beschaffung der **Sequenzinformationen** sehr schwierig, so dass die Entwicklung neuer, DNA-basierter Nachweisverfahren in diesen Fällen nicht möglich ist. Die europäische GVO-Datenbank EUginius (<https://www.euginius.eu>) listet daher neben den klassischen GVO auch einige genomeditierte Organismen auf und bietet z. T. auch detaillierte Informationen bezüglich der genetischen Modifikation(en). Diese Datenbank enthält jedoch nur eine Auswahl und keine vollständige Liste der genomeditierten Organismen.

Unter Verwendung von DNA-basierten Nachweisverfahren ist es generell möglich, auch kleine Modifikationen der DNA, sofern sie vorher bekannt sind, nachzuweisen. Allerdings ist die eindeutige Identifizierung im Sinne eines Event-spezifischen Nachweises durchzuführen. Das ENGL führt diesbezüglich aus, dass es selbst für Hersteller von genomeditierten Organismen schwer bis unmöglich sein dürfte, entsprechende Event-spezifische Nachweismethoden bei der Zulassung in der EU zur Verfügung zu stellen.

Vorschlag der EU-Kommission zur Neuregelung genomeditierter Pflanzen

Die aktuelle rechtliche Situation in der Europäischen Union bezüglich genomeditierter Pflanzen ist aus wissenschaftlicher und wirtschaftlicher Sicht, aber auch aus Sicht der Überwachung sehr unbefriedigend. Um den neuen Entwicklungen Rechnung zu tragen, hat die EU-Kommission im Juli 2023 einen Vorschlag für eine Änderung der Gentechnikgesetzgebung bei genomeditierten Pflanzen veröffentlicht.

Darin werden die mittels neuer genomischer Techniken hergestellte Pflanzen in zwei Kategorien eingeteilt: genomeditierte Pflanzen, die keine Fremdgene enthalten und deren Veränderung auch auf natürliche Weise entstehen könnte, sollen zur Kategorie 1 zugeteilt werden, alle anderen genomeditierten Pflanzen zur Kategorie 2.

Genomeditierte Pflanzen der Kategorie 1 werden konventionell gezüchteten Pflanzen in den meisten Punkten gleichgestellt. Wichtige Ausnahmen sind u. a. diese folgenden Punkte:

- Eintrag in eine Datenbank
- Kennzeichnungspflicht für Saatgut
- Notifizierungspflichten
- keine Anwendung im Ökolandbau
- Sortenzulassung mit einer angepassten Sicherheitsbewertung bleibt bestehen

Pflanzen der Kategorie 2 sollen unter die EU-Gentechnikregulierung fallen, jedoch mit einem angepassten Zulassungsprozess.

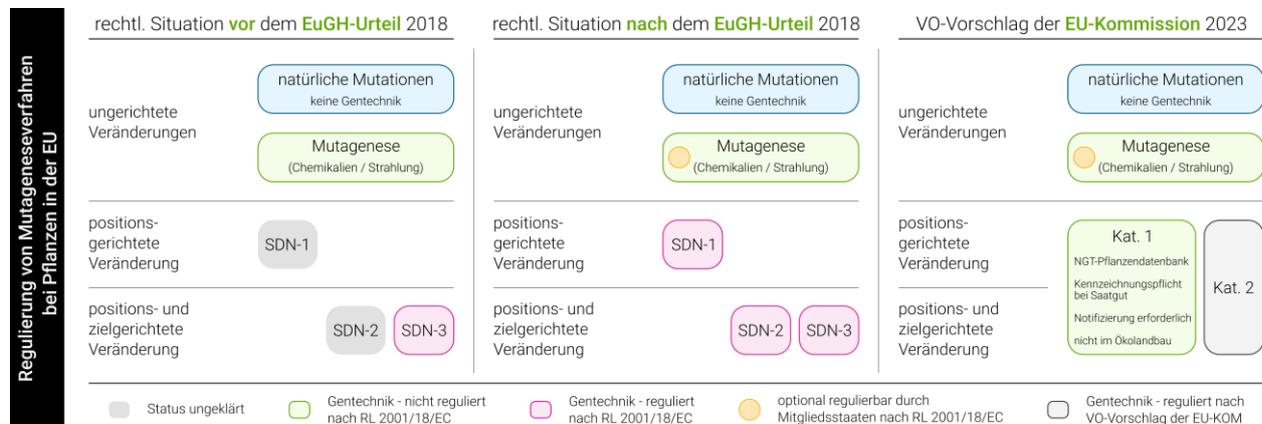


Abbildung 6: Änderungen der rechtlichen Situation für genomeditierte Pflanzen in der Europäischen Union

Position der AG „Biochemische und molekularbiologische Analytik“ der GDCh

Die Entwicklung von Nachweismethoden für Organismen, die unter Verwendung der neuen genomischen Techniken hergestellt wurden, ist ohne geeignetes Referenzmaterial und valide Sequenzinformationen nicht möglich. Selbst wenn diese beiden Voraussetzungen erfüllt sind, können zwar kleine DNA-Modifikationen nachgewiesen werden, jedoch nicht die Technik, mit der diese DNA-Modifikationen in die Pflanze eingebracht wurden. Somit lassen sich genetische Modifikationen zwar nachweisen, genomeditierte Organismen jedoch nicht eindeutig identifizieren [33]. Eine Kontrolle und rechtssichere Identifizierung von genomeditierten Organismen, die nur einzelne, kleine Punktmutationen aufweisen, ist daher nach derzeitigem Stand der Wissenschaft nicht möglich.

LITERATUR

1. EUROPEAN COMMISSION (2001) - Directive 2001/18/EC on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. Official Journal of the European Union, L 106/1.
2. AgbioInvestor (2024) – AgbioInvestor GM Monitor. <https://gm.agbioinvestor.com/>.
3. EUROPEAN COMMISSION (2003) - Regulation (EC) No 1829/2003 on genetically modified food and feed. Official Journal of the European Union, L 268/1.
4. EUROPEAN COMMISSION (2003) - Regulation (EC) No 1830/2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms. Official Journal of the European Union, L 268/24.
5. EUROPEAN COMMISSION - EU Register of authorised GMOs. <https://webgate.ec.europa.eu/dyna2/gm-register/>.
6. ARBEITSKREIS LEBENSMITTELCHEMISCHER SACHVERSTÄNDIGER DER LÄNDER UND DES BUNDESAMTES FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (ALS) (2019) - 113. ALS-Sitzung - Stellungnahme 2019/06. Journal of Consumer Protection and Food Safety, 14; 4: 429.
7. ARBEITSKREIS LEBENSMITTELCHEMISCHER SACHVERSTÄNDIGER DER LÄNDER UND DES BUNDESAMTES FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (ALS) (2019) - 113. ALS-Sitzung - Stellungnahme 2019/07. Journal of Consumer Protection and Food Safety, 14; 4: 429.

8. **EUROPEAN COMMISSION** (2004) - *Commission recommendation of 4 October 2004 on technical guidance for sampling and detection of genetically modified organisms and material produced from genetically modified organisms as or in products in the context of Regulation (EC) No 1831/2003*. Official Journal of the European Union, L348/18.
9. **S. PECORARO, G. BERBEN, M. BURNS, P. CORBISIER, M. DE GIACOMO, M. DE LOOSE, E. DAGAND, D. DOBNIK, R. ERIKSSON UND A. HOLST-JENSEN** (2019) - *Overview and recommendations for the application of digital PCR*. EUR 29673 EN; Publications Office of the European Union: Luxembourg. JRC115736.
10. **A. IWABI, L. GERDES, U. BUSCH UND S. PECORARO** (2016) - *Droplet digital PCR for routine analysis of genetically modified foods (GMO) – A comparison with real-time quantitative PCR*. Food Control, 69: 205.
11. **P. GUERTLER, A. HAHN, U. BUSCH UND K.-H. ENGEL** (2017) - *DNA-based detection of GM ingredients*. Advances in Food Diagnostics: 205.
12. **P. CORBISIER, A. BARBANTE, G. BERBEN, W. BROOThAERTS, M. DE LOOSE, H. EMONS, T. GEORGIEVA, A. LIEVENS, M. MAZZARA UND N. PAPAZOVA** (2017) - *Recommendation for the unit of measurement and the measuring system to report traceable and comparable results expressing GM content in accordance with EU legislation*. Joint Research Centre; EUR28536 EN, doi 10.2760/177516.
13. **BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (BVL)** (2016) - *Leitlinien zur Einzellabor-Validierung qualitativer real-time PCR Methoden*.
https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/07_Untersuchungen/Leitlinien%20zur%20Einzellabor%20Validierung.html.
14. **B. J. HINDSON, K. D. NESS, D. A. MASQUELIER, P. BELGRADER, N. J. HEREDIA, A. J. MAKAREWICZ, I. J. BRIGHT, M. Y. LUCERO, A. L. HIDDENSEN, T. C. LEGLER, T. K. KITANO, M. R. HODEL, J. F. PETERSEN, P. W. WYATT, E. R. STEENBLOCK, P. H. SHAH, L. J. BOUSSE, C. B. TROUP, J. C. MELLEN, D. K. WITTMANN, N. G. ERNDT, T. H. CAULEY, R. T. KOEHLER, A. P. SO, S. DUBE, K. A. ROSE, L. MONTESCLAROS, S. WANG, D. P. STUMBO, S. P. HODGES, S. ROMINE, F. P. MILANOVICH, H. E. WHITE, J. F. REGAN, G. A. KARLIN-NEUMANN, C. M. HINDSON, S. SAXONOV UND B. W. COLSTON** (2011) - *High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number*. Analytical Chemistry, 83; 22: 8604.
15. **C. M. HINDSON, J. R. CHEVILLET, H. A. BRIGGS, E. N. GALLICHOTTE, I. K. RUF, B. J. HINDSON, R. L. VESSELLA UND M. TEWARI** (2013) - *Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR*. Nature Methods, 10; 10: 1003.
16. **P. GÜRTLER UND S. PECORARO** (2023) - *Evolution der PCR – von der klassischen PCR zur digitalen PCR*. Immunoassays, Kapitel 7, 2. Auflage, S. 141-163, Springer-Verlag Berlin.
17. **P. CORBISIER, G. BUTTINGER, C. SAVINI, M. G. SACCO, F. GATTO UND H. EMONS** (2022) - *Expression of GM content in mass fraction from digital PCR data*. Food control, 133: 108626.
18. **BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (BVL)** (2023) - *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren - Leitlinien zur Verifizierung von Methoden mittels digitaler PCR (Arbeitsgruppe § 64 LFGB „GVO-Nachweis)*
https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/07_Untersuchungen/Leitlinien_Verifizierung_Methoden_digital_e_PCR.html?nn=11009496.
19. **PROJEKTGRUPPE DER LAV ARBEITSGRUPPE FUTTERMITTEL UNTER BETEILIGUNG DES BUNDES UND DES ARBEITSKREISES PCR DER FACHGRUPPE FUTTERMITTEL IM VDLUFA** (2021) - *Leitfaden zur Kontrolle von GVO in Futtermitteln; Version 3*.
https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/02_Futtermittel/fm_leitfaden_kontrolle_GVO.pdf?blob=publicationFile&v=4.
20. **ARBEITSKREIS LEBENSMITTELCHEMISCHER SACHVERSTÄNDIGER DER LÄNDER UND DES BUNDESAMTES FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (ALS)** (2022) - *Stellungnahme 2016/01: Leitfaden zur Kontrolle gentechnischer Veränderungen in Lebensmitteln*.
https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/ALS_ALTS/Leitfaden%20zur%20Kontrolle%20gentechnischer%20Ver%C3%A4nderungen%20in%20Lebensmitteln_Stand%2030.03.2022.pdf;jsessionid=88CF4CD546D4D7B5665269D1C5CCA548.1_cid363?blob=publicationFile&v=2.
21. **P. GUERTLER, C.-K. BAILLIE, O. GOERLICH, S. ESTENDORFER-RINNER UND A. E. BAIKER** (2019) - *Genome Editing*. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Band 11 der Schriftenreihe Gentechnik für Umwelt und Verbraucherschutz. https://www.bestellen.bayern.de/shoplink/lgl_gentechnik_00009.htm.

22. **S. M. SCHMIDT, M. BELISLE UND W. B. FROMMER** (2020) - *The evolving landscape around genome editing in agriculture: many countries have exempted or move to exempt forms of genome editing from GMO regulation of crop plants*. EMBO reports, 21; 6: e50680.
23. **A. H. SCHULMANN, K. M. OKSMAN-CALDENTY UND T. H. TEERI** (2020) - *European Court of Justice delivers no justice to Europe on genome-edited crops*. Plant Biotechnology Journal, 18; 1: 8.
24. **EUROPEAN COMMISSION** (2021) - *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*. SWD, 92.
25. **O. DIMA, Y. HEYVAERT UND D. INZÉ** (2022) - *Interactive database of genome editing applications in crops and future policy making in the European Union*. Trends in plant science.
26. **E. ANDERSEN UND K. SCHREIBER** (2020) - *“Genome Editing” vor dem EuGH und seine Folgen*. Natur und Recht, 42; 2: 99.
27. **GERICHTSHOF DER EUROPÄISCHEN UNION** (2018) - *Urteil vom 25.07.2018, C-528/16, EU:C:2018:583*.
28. **P. CHHALLIYIL, H. ILVES, S. A. KAZAKOV, S. J. HOWARD, B. H. JOHNSTON UND J. FAGAN** (2020) - *A real-time quantitative PCR method specific for detection and quantification of the first commercialized genome-edited plant*. Foods, 9; 9: 1245.
29. **EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES (ENGL)** (2015) - *Definition of minimum performance requirements for analytical methods for GMO testing*. http://gmo-url.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%2020_10_2015.pdf.
30. **C. WEIDNER, S. EDELMANN, D. MOOR, K. LIESKE, C. SAVINI, S. JACCHIA, M. G. SACCO, M. MAZZARA, J. LÄMKE UND K. N. ECKERMANN** (2022) - *Assessment of the real-time PCR method claiming to be specific for detection and quantification of the first commercialised genome-edited plant*. Food Anal. Methods: 1.
31. **P. GUERTLER, S. PALLARZ, A. BELTER, K. N. ECKERMANN UND L. GROHMANN** (2023) - *Detection of commercialized plant products derived from new genomic techniques (NGT)-Practical examples and current perspectives*. Food Control: 109869.
32. **EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES (ENGL)** (2019) - *Detection of food and feed plant products obtained by new mutagenesis techniques*. 26 March 2019 (JRC116289).
33. **W. BROOHTAERS, C. SAVINI, M. MAZZARA UND S. SOWA** (2023) - *Detection of food and feed plant products obtained by targeted mutagenesis and cisgenesis*, EUR 31521 EN. Publications Office of the European Union, Luxembourg, ISBN 978-92-68-03934-2.