



Sachstand

Ausgewählte Fragen zum Forschungsstand der Anwendung von Genom-Editierung in Nutzpflanzen

Ausgewählte Fragen zum Forschungsstand der Anwendung von Genom-Editierung in Nutzpflanzen

Aktenzeichen: WD 8 - 3000 - 073/18
Abschluss der Arbeit: 24. August 2018
Fachbereich: WD 8: Umwelt, Naturschutz, Reaktorsicherheit, Bildung und Forschung

Die Wissenschaftlichen Dienste des Deutschen Bundestages unterstützen die Mitglieder des Deutschen Bundestages bei ihrer mandatsbezogenen Tätigkeit. Ihre Arbeiten geben nicht die Auffassung des Deutschen Bundestages, eines seiner Organe oder der Bundestagsverwaltung wieder. Vielmehr liegen sie in der fachlichen Verantwortung der Verfasserinnen und Verfasser sowie der Fachbereichsleitung. Arbeiten der Wissenschaftlichen Dienste geben nur den zum Zeitpunkt der Erstellung des Textes aktuellen Stand wieder und stellen eine individuelle Auftragsarbeit für einen Abgeordneten des Bundestages dar. Die Arbeiten können der Geheimschutzordnung des Bundestages unterliegende, geschützte oder andere nicht zur Veröffentlichung geeignete Informationen enthalten. Eine beabsichtigte Weitergabe oder Veröffentlichung ist vorab dem jeweiligen Fachbereich anzuzeigen und nur mit Angabe der Quelle zulässig. Der Fachbereich berät über die dabei zu berücksichtigenden Fragen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
2.	Grundlagen	5
2.1.	Gentechnik, Gentechnologie	5
2.2.	Genetische Veränderungen	5
2.3.	Grundlegende Techniken	6
2.4.	Genscheren	6
3.	Potenziale und Risiken des Einsatzes von Genscheren in der Landwirtschaft	8
3.1.	Chancen	9
3.2.	Risiken/ Unbeabsichtigte Effekte	15
3.2.1.	Off-Target Effekte	15
3.2.2.	Verbleiben von sgRNA-Cas9 Expressionskassette in der modifizierten Pflanzen	16
3.3.	Zum Nachweis des Einsatzes von Genscheren	16

1. Einleitung

In jüngster Zeit, mit der Entdeckung der sogenannten „**Genscheren**“ wird die bereits seit mehr als 20 Jahren geführte Debatte zu Chancen und Risiken sowie der ethischen Vertretbarkeit von Eingriffen in das Erbgut von Menschen, Tieren und Pflanzen mit neuer Intensität geführt. Die hohe Präzision und Effizienz macht eine Neubewertung des Einsatzes der Technologie erforderlich.

Im Vordergrund der aktuellen öffentlichen Debatte des Einsatzes neuer biologischer Technologien in der Medizin und Landwirtschaft steht klar der Einsatz von Genscheren und hier insbesondere Crispr/Cas. Allerdings ist dies nicht die einzige Methodik zur (gezielten) Veränderung im Genom. „**Genom-Editierung**“ (auch „**genome editing**“, „**gene editing**“) ist ein Sammelbegriff für verschiedene „neue“ Methoden, die es erlauben, zielgerichtete Eingriffe im Erbmateriale durchzuführen. Dazu zählen u. a. folgende Techniken: Mutagenese mit Hilfe von Zinkfinger-Nukleasen oder TALEN (Transcription Activator-like Effector Nuclease), Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese (OGM; engl.: ODM) und CRISPR/Cas9, CRISPR/Cpf1. Mit allen diesen Verfahren können gezielte Veränderungen im Genom des Zielorganismus eingeführt werden. „Dafür sind zwei Komponenten nötig: Ein Protein (Nuklease), das die DNA des Zielorganismus schneidet, und ein „Lotse“, der diese Nuklease an die gewünschte Stelle der DNA leitet. Dabei wird der „Lotse“ (je nach Technik ein Stück DNA, eine RNA oder ein Protein) passgenau so hergestellt, dass er die gewünschte Stelle im Genom des Zielorganismus „erkennt“. Die Nuklease kann entweder von außen in die Zelle eingebracht werden (CRISPR/Cas9, TALEN, Zinkfinger-Nuklease) oder natürlicherweise in der Zelle vorhanden sein (ODM).“¹ Ein entscheidender Durchbruch für die Anwendung von CRISPR-Cas9 für die Genom-Editierung gelang im Jahr 2012, als die Arbeitsgruppen um Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna die grundlegenden Mechanismen des Systems entschlüsselten und damit erstmalig strategisch anpassen konnten.

Die Liste der Erfolge und Potenziale, die sich durch die Anwendung der neuen Technologie eröffnen, ist lang. In der Datenbank wissenschaftlicher Publikationen „Pub Med“² ist ein exponentieller Anstieg wissenschaftlicher Publikationen, die in irgendeiner Weise die CRISPR/Cas Technologie mindestens erwähnen, zu verzeichnen: Waren dies im Jahr 2013 noch 78 Publikationen, findet man 2014 bereits 315; 2015: 716 und 2016: 1406 Veröffentlichungen. Ähnliche Ergebnisse sind mit der Suche nach Begriffen wie „genome editing“ festzustellen.

Gerade in der Pflanzenzüchtung wird das Anwendungspotential vergleichsweise hoch eingeschätzt. Vor dem Hintergrund klimatischer Veränderungen und ernährungsrelevanter Überlegungen wird immer wieder von Seiten der Wissenschaft und der Öffentlichkeit eine große Chance für die zukünftige globale Lebensmittelsicherheit durch die weitere Erforschung von genome editing in der Pflanzenzüchtung betont. So stellen Armon Scheben und David Edwards in einem Kommentar-Artikel in der Zeitschrift „Science“ fest: „Genome-editing technologies such as the CRISPRCas system show promise for helping to address these challenges, if the precision

1 Quelle und weitere Informationen des Bundesinstituts für Risikobewertung BfR: : <https://mobil.bfr.bund.de/cm/343/fragen-und-antworten-zum-genome-editing-und-crispr-cas9.pdf> [zuletzt abgerufen am 27. August 2018].

2 Internetverweis: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> [zuletzt abgerufen am 24. August 2018].

of genome editing is improved and the technology is approved and accepted by regulators, producers, and consumers.“³

In der vorliegenden Arbeit wird nach der knappen Darstellung einiger Grundlagen auf den wissenschaftlichen Stand der Chancen und Risiken, die sich bei der Anwendung von Genom-Editierung in der Pflanzenzüchtung ergeben, eingegangen.

2. Grundlagen

2.1. Gentechnik, Gentechnologie

Die Gentechnologie ist ein Teilgebiet der molekularen Genetik. Dabei werden Grundlagen und praktische Anwendungen der Isolierung von Erbmaterial, deren Analyse und die gezielte Veränderung und Neukombination sowie die daraus resultierenden Signalkaskaden untersucht. Es wird beispielsweise gentechnisches Material analysiert, verändert, ggf. vermehrt und in andere Zellen in oder außerhalb von Organismen eingebracht.

2.2. Genetische Veränderungen

In der Natur kommen spontan auftretende Veränderungen des Erbguts vor, d.h. die Basensequenz wird verändert. Bei Tieren und Menschen können diese **Mutationen** Körperzellen betreffen und werden daher nicht vererbt. Treten sie aber in den Keimzellen auf, werden sie den nachfolgenden Nachkommen weitergegeben. Die Mutationsrate ist vergleichsweise niedrig, kann aber beispielsweise durch Chemikalien, Temperatur oder Strahlen deutlich erhöht werden. Bei der Erklärung von Tumorentstehungsprozessen spielen derartige Mutationen beispielsweise eine wichtige Rolle. Wichtig ist zu bemerken, dass diese Veränderungen nicht gezielt auftreten, erst durch einen nachfolgenden Selektionsprozess können sich einzelne Veränderungen als vorteilhaft oder negativ erweisen (Beispiel: Sichelzellanämie). Demgegenüber steht eine zielgerichtete Veränderung des Erbguts an bestimmten Stellen, wie sie durch neue technologische Methoden wie die Genschere erfolgt. Hierbei kann eine Veränderung gezielt und an einer vorher bestimmten Stelle herbeigeführt werden. Prinzipiell könnten Veränderungen auch durch Zufall erfolgen, die Wahrscheinlichkeit ist aber je nach Veränderung derart niedrig, dass sie im Allgemeinen als „unmöglich“ bezeichnet wird.

Auch bei Pflanzen treten spontane, d.h. natürlich verursachte, oder durch Mutagene induzierte Veränderung des Erbguts auf, die sich möglicherweise phänotypisch⁴ manifestieren. Ist die Mutation nicht sinnvoll oder sogar nachteilig, werden die betroffenen Individuen weniger in der Lage sein, sie weiterzugeben und dadurch wird die Mutation selten bleiben oder ganz verschwinden. In der Pflanzenzüchtung spielen die induzierten Veränderungen eine herausragende Rolle. Hierbei werden Samen und Pollen den Mutagenen ausgesetzt. Allerdings gibt es auch sich vegetativ

3 Armin Scheben, David Edwards: Genome editors take on crops Genome editing technologies may help to enhance global food security; Science vom 17. März 2017; VOL 355 ISSUE 6330.

4 Erscheinungsbild eines Organismus.

vermehrnde Pflanzen; hierbei werden die entsprechenden Organe den Mutagenen ausgesetzt, durch die die Vermehrung erfolgt (z.B. Steckreiser oder Knollen).⁵

2.3. Grundlegende Techniken

Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Dieses technische Verfahren wird zur schnellen Vervielfältigung von Erbgut-Abschnitten eingesetzt. Es wird beispielsweise auch in der Kriminologie verwendet (Erbgut-Isolierung aus Speichelresten, Blutresten und Haaren).

Sequenzierung: Bestimmung der Basensequenz-Abfolge in einem Erbgut-Molekül.

Klonierung/Klonen: Als Klonierung bezeichnet man die Herstellung genetisch identischer Zellen (Klone). Die identische Vermehrung ganzer Organismen wird hingegen zumeist als Klone bezeichnet.

Gen-Knockout: Hierunter versteht man das vollständige Abschalten eines Gens im Erbgut eines Organismus. Dies wird zumeist dadurch erreicht, dass man mittels sogenannter homologer Rekombination gezielt einzelne Bereiche „ausschaltet“.

2.4. Genschere

Eine Einführung in die Thematik der Genomchirurgie findet sich in einem Aktuellen Begriff des Deutschen Bundestags aus dem Jahr 2016.⁶

Wie bereits erwähnt, stellt die zielgerichtete Korrektur von Genen bei der Gentherapie ein erhebliches Problem dar. Die Entdeckung eines bakteriellen Abwehrsystems führte 2012 zur Veröffentlichung eines Mechanismus in Bakterien namens CRISPR/Cas9, das auch zur Genom-Editierung/Genomchirurgie genutzt werden kann. Hiermit hat man eine „Genschere“ in der Hand, mit der man vergleichsweise einfach und präzise - gleichsam „chirurgisch“ - das Erbgut gezielt durch Ausschneiden und/oder Einfügen verändern kann. Allerdings kann man verfahrensbedingt hinterher nicht mehr ohne weiteres nachweisen, ob es sich um eine „natürliche“ Erbgutveränderung (Mutation) handelt oder um eine gentechnologisch herbeigeführte Veränderung. In kürzester Zeit wurde, wie bereits einleitend erwähnt, die Methode weltweit angewandt und eine Fülle von Publikationen zu gentechnischen Veränderungen folgte. Für die Pflanzenzüchtung ist auch die Methodik der Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese wichtig. Allerdings ist die ODM nicht derart bedeutend wie die Mutagenese mit Hilfe von Zinkfinger-Nukleasen oder TALEN und CRISPR/Cas. Bei Durchführung einer Mutagenese per ODM-Technik werden kurze Oligonukleotide in die pflanzliche Zelle eingebracht. Nun ist es möglich, dass diese eine kleine Veränderung in einer Region im Genom hervorruft, die der eingebrachten Sequenz ähnelt. Allerdings ist die

5 Quelle: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/mutationszuechtung/44520> [zuletzt abgerufen am 15. August 2018].

6 Steinhoff, C. und Winter A.: Genomchirurgie, Aktueller Begriff der Wissenschaftlichen Dienste des Deutschen Bundestages, 01/16, vom 21. Januar 2016. Im Internet abrufbar unter: <https://www.bundestag.de/blob/403174/5ac5e95e76bb3baf20b0021990dda878/genomchirurgie-data.pdf> [zuletzt abgerufen am 15. August 2018].

Effizienz, mit der eine DNA-Sequenz verändert wird, beim CRISPR/Cas-Verfahren wesentlich höher als bei dem ODM-Verfahren.

Grundlegend für die Entwicklung der CRISPR/Cas Technologie war die Entdeckung der Restriktionsendonukleasen (Genschere) vor mehr als 40 Jahren. Diese können gezielt Gene im Genom eines Organismus verändern. Später wurden als steuerbare Genschere sogenannte Zinkfinger-Nukleasen, TALENs (transcription activatorlike effector nucleases) und CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats – CRISPR-associated proteins) entdeckt.

Während Versuche zur Veränderung von menschlichen Embryonen und der Eingriff in die menschliche Keimbahn von einer deutlichen Mehrheit abgelehnt werden, ist das große Potenzial, das die Methodik aufweist, nicht von der Hand zu weisen. So konstatieren die Autoren des 2015 erschienenen Dritten Gentechnologiebericht der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften⁷: **"Die neuen Methoden versprechen effiziente, gezielte und damit besser kontrollierbare Erbgutveränderungen, als dies mit den bisherigen möglich war. Sie eröffnen neue Dimensionen für die gesamte molekularbiologische Grundlagenforschung sowie die Anwendung, insbesondere in der Pflanzenzüchtung, der industriellen Biotechnologie und der Biomedizin."**⁸

Der Deutsche Ethikrat hat auf verschiedenen Veranstaltungen die ethischen Dimensionen des Genom-Editing beleuchtet. Die Jahrestagung 2016 war gänzlich der Fragestellung der Anwendung neuer gentechnologischer Methoden am Menschen gewidmet: „Zugriff auf das menschliche Erbgut. Neue Möglichkeiten und ihre ethische Beurteilung.“⁹ Eine Diskussionsveranstaltung des Deutschen Ethikrats im Februar 2017 stellte mit dem Titel die Frage: „Brauchen wir eine neue Gentechnik-Definition? Naturwissenschaftliche, ethische und rechtliche Perspektiven der Regulierung genom-editierter Pflanzen“.¹⁰ In diesem Zusammenhang äußerte sich der Präsident der Leopoldina, Jörg Hacker: **„Wir brauchen zeitnah eine gesetzliche Regelung, ob genom-editierte Nutzpflanzen generell als gentechnisch veränderte Organismen gelten sollen oder ob man eher in Einzelfallbetrachtungen die spezifischen Eigenschaften der erzeugten Pflanzensorten einer Risikobewertung unterzieht“**¹¹. Katja Becker, Vizepräsidentin der DFG sagt: „Wir wünschen uns

7 Bernd Müller-Röber, Nediljko Budisa, Julia Diekämper, Silke Domasch, Boris Fehse, Jürgen Hampel, Ferdinand Hucho, Anja Hümpel, Kristian Köchy, Lilian Marx-Stölting, Jens Reich, Hans-Jörg Rheinberger, Hans-Hilger Ropers, Jochen Taupitz, Jörn Walter, Martin Zenke (Hrsg.): Dritter Gentechnologiebericht, Analyse einer Hochtechnologie in Deutschland, Baden-Baden 2015, 476 S. ISBN 978-3-8487-0327-2, im Internet abrufbar unter: <http://www.bbaw.de/startseite-1/teaser/gentechnologiebericht> [zuletzt abgerufen am 15. August 2018].

8 Ebd., Seite 13.

9 Quelle: <http://www.ethikrat.org/veranstaltungen/jahrestagungen/zugriff-auf-das-menschliche-erbgut> [zuletzt abgerufen am 15. August 2018]

10 Quelle: <http://www.ethikrat.org/dateien/pdf/tagung-14-02-2017-simultanmitschrift.pdf> [zuletzt abgerufen am 15. August 2018]

11 Quelle: <https://www.leopoldina.org/de/presse/pressemitteilungen/pressemitteilung/press/2463/> [zuletzt abgerufen am 15. August 2018]

eine sachliche Diskussion darüber, ob die bisherige Betrachtung nicht mittlerweile obsolet geworden ist und durch eine produktorientierte Sicherheitsbewertung ersetzt werden sollte.“¹²

3. Potenziale und Risiken des Einsatzes von Genscheren in der Landwirtschaft

Wie schon angeführt ist die Anzahl der wissenschaftlichen Publikationen zum Thema Gene Editing in den vergangenen Jahren exponentiell angestiegen. Nachfolgend wird exemplarisch auf drei aktuelle Übersichtsartikel eingegangen, die sich mit der Thematik der Chancen und Risiken in der Anwendung von „gene editing“ im Bereich „crop sciences“ beschäftigen:

- L. Arora, A. Marula: Gene Editing and Crop Improvement Using CRISPR-Cas9 System; Front. Plant Sci., 8.November 2017; <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01932>
- D. Jaganathan, K. Ramasamy, G. Sellamuthu, S. Jayabalan, G. Venkataraman: CRISPR for Crop Improvement: An Update Review; Front Plant Sci. 2018; 17. Juli 2018; 9:985. doi: 10.3389/fpls.2018.0098
- S. B. Aglawe, K. M. Barbadikar, S. K. Mangrauthia; M. S. Madhav: New breeding technique “genome editing” for crop improvement: applications, potentials and challenges; Biotech (2018) 8:336; 23. Juli 2018; <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1355-3>

Zum Stand der Anwendung in der Pflanzenzüchtung finden sich auch im **„Wissenschaftlicher Bericht zu den neuen Techniken in der Pflanzenzüchtung und der Tierzucht und ihren Verwendungen im Bereich der Ernährung und Landwirtschaft“** der Ressortforschungseinrichtungen Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL); Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR); Thünen-Institut (TI); Max Rubner-Institut (MRI); Friedrich Löffler-Institut (FLI) und Julius Kühn-Institut (JKI) von Juli 2017 umfangreiche Informationen.¹³

Desweiteren hat das österreichische Bundesministerium für Gesundheit und Frauen (BMGF) im März 2017 eine Darstellung zu **„Grundlagen zur Bewertung neuer Techniken in der Pflanzenzüchtung: RNA-abhängige Techniken, Accelerated Breeding und CRISPR-Cas“** veröffentlicht. Hierin wird primär auf die Darstellung der unterschiedlichen Techniken eingegangen.¹⁴

12 Ebd.

13 Bartsch, D. et al.: Wissenschaftlicher Bericht zu den neuen Techniken in der Pflanzenzüchtung und der Tierzucht und ihren Verwendungen im Bereich der Ernährung und Landwirtschaft; überarbeitete Fassung vom 23.02.2018; Forschungsbericht BfR, insbesondere Seite 61 ff; https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/00_allgemein/Bericht_Neue_Zuechtungstechniken%2023-02-2018.pdf?__blob=publicationFile&v=9 [zuletzt abgerufen am 15. August 2018]

14 Bundesministerium für Gesundheit und Frauen (BMGF), Herausgeber: Grundlagen zur Bewertung neuer Techniken in der Pflanzenzüchtung: RNA-abhängige Techniken, Accelerated Breeding und CRISPR-Cas. März 2017; im Internet abrufbar unter: https://www.bmgf.gv.at/cms/home/attachments/2/5/0/CH1052/CMS1493814297724/techniken_pflanzenzuechtung_kurz_20170323.pdf [zuletzt abgerufen am 15. August 2018]

3.1. Chancen

Nach einer detaillierten Einführung in die technologischen Details der modernen gene editing Technologie bei Pflanzen wird in dem 2017 erschienenen Übersichtsartikel „**Gene Editing and Crop Improvement Using CRISPR-Cas9 System**“ auf derzeit bereits erprobte und bevorstehende Anwendungen in der Pflanzenzüchtung eingegangen.¹⁵

Bislang seien die Mehrheit der Forschungsstudien im Bereich der CRISPR/Cas9-Technologie zu Gen-Knockout¹⁶ oder Gen-Silencing¹⁷-Mechanismen über NHEJ¹⁸ durchgeführt worden. Dies sei nicht der präziseste Mechanismus. Gene-Knock-in oder auch Gensatz-Strategien nach gezielter Mutagenese über HDR¹⁹ zeigten vielversprechende Ergebnisse in Säugetier- und Pflanzenzellen. Aufgrund der niedrigen Effizienz und des schwierigen Transports der homologen Geber-Sequenz in Pflanzenzellen war HDR relativ schwierig. Inzwischen gibt es mehrere effiziente Ansätze (Collonnier et al., 2017; Humanes et al., 2017).²⁰ Genomische Studien an Holzgewächsen sind wegen der langen vegetativen Perioden, der geringen genetischen Transformationseffizienz und begrenzten Anzahl an Mutanten schwierig. CRISPR/Cas9 wurde auch bei Algen, Bryophyten, Pteridophyten, etc. angewandt. Lebermoose stellen dabei gewissermaßen einen Modellorganismus für die Studien der Evolution von Landpflanzen dar. Derzeit liegt der Fokus der gezielten Anwendung der CRISPR/CAS-Technologie bei Pflanzen in der „Verlust-einer-Funktion-“ und „Funktionsgewinnanalyse“ einzelner Gene und der Identifizierung von Genmodulen und genetischer Expressionsuntersuchung. In der nachfolgenden Abbildung wird die Anwendung bereits etablierter oder noch zu testender Anwendungen des CRISPR/Cas9-Systems verdeutlicht. Dabei hat mittlerweile die Technologie die RNA-Interferenz (RNAi)²¹-Technologie ersetzt (die mit zahlreichen Einschränkungen verbunden war). Die Entwicklung der gleichzeitigen Expression von sog. „mul-

15 Seite 13f in: L. Arora, A. Marula: Gene Editing and Crop Improvement Using CRISPR-Cas9 System; Front. Plant Sci., 8.November 2017; <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01932> [zuletzt abgerufen am 15. August 2018].

16 Vollständiges Ab-/Ausschalten eines Gens im Genom eines Organismus.

17 Hemmung des Ablesens (Transkription) einer genetischen Information von der DNA auf die mRNA (Boten-RNA gewissermaßen als Vermittler zwischen Erbsubstanz und dem Funktion ausübendem Protein) oder der nachfolgenden Übersetzung (Translation) der auf der mRNA gespeicherten Information in ein Protein.

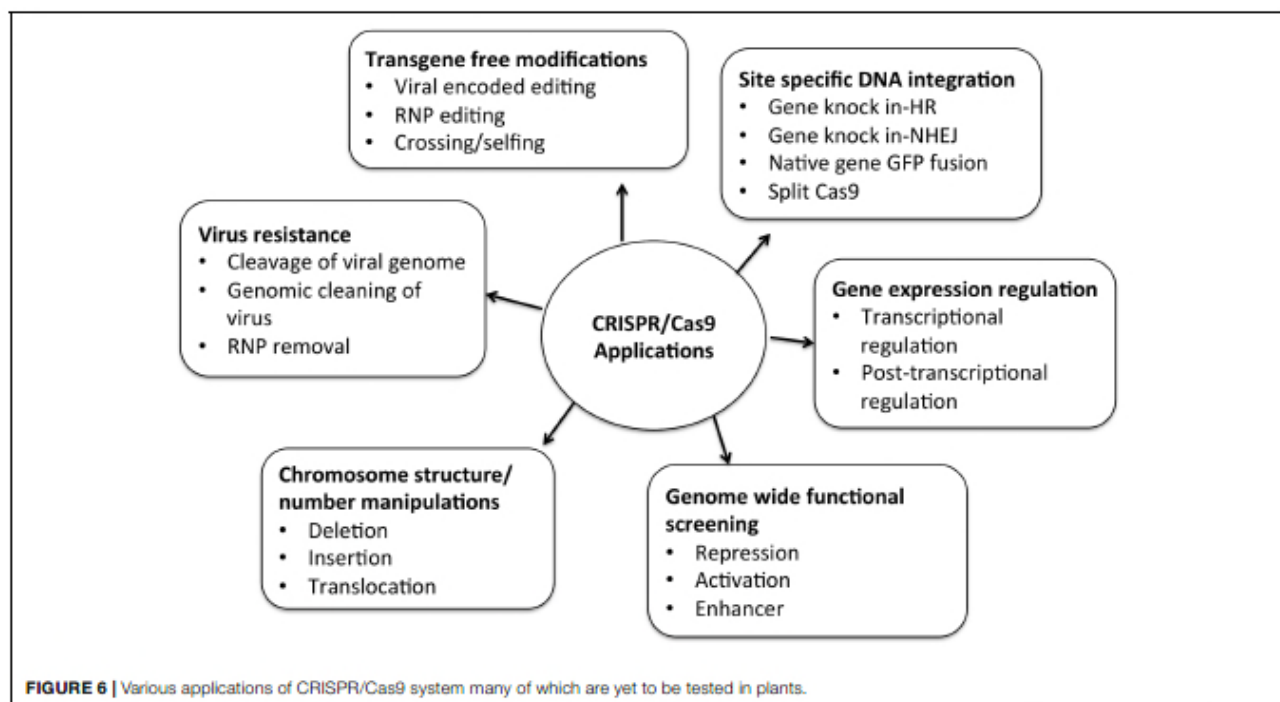
18 Non-homologous end joining (NHEJ): Spezifischer Vorgang, der Doppelstrangbrüche in der DNA repariert. Mittels NHEJ werden Gene gezielt inaktiviert.

19 Homology directed repair (HDR): Doppelstrangbruch-Reparatur, mittels derer ein gezieltes Einfügen definierter Mutationen oder ganzer DNA-Abschnitte ins Genom möglich ist.

20 Collonnier, C., DebasT, A. G., Maclot, F., Mara, K., Charlot, F., and Nogue, F. (2017). Towards mastering CRISPR-induced gene knock-in in plants: survey of key features and focus on the model *Physcomitrella patens*. *Methods* 121-122, 103–117. doi: 10.1016/j.ymeth.2017.04.024; Humanes, J. G., Wang, Y., Liang, Z., Shan, Q., Ozuna, C. V., and Sanchez-Leoin, S. (2017). High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. *Plant J.* 89, 1251–1262. doi: 10.1111/tj.13446 [zuletzt abgerufen am 15. August 2018].

21 Die RNA-Interferenz ist ein „Abschalt“-Mechanismus in den Zellen von Lebewesen mit einem Zellkern (Eukaryoten), welcher der zielgerichteten Abschaltung von Genen dient.

multiple guide RNAs“ (sgRNAs) im CRISPR/Cas9 System erlaubt eine "Multiplex-Genombearbeitung." Hierdurch können Multiplex-Gen-Knockouts²² erzeugt werden. Es wurde auch zur Erzeugung chromosomaler Deletionen in Arabidopsis, Nicotiana benthamiana etc. angewandt.



Quelle: Seite 14 in L. Arora, A. Marula: Gene Editing and Crop Improvement Using CRISPR-Cas9 System; Front. Plant Sci., 8.November 2017; <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01932>

Eine Beispielliste für Pflanzen, die mittels CRISPR/Cas9 resistent gegenüber spezifischen Krankheiten sind, findet sich in der nachfolgenden Liste:

TABLE 5 | List of some crops that are made resistant to diseases via CRISPR/Cas9 system.

Crop	Disease/symptoms	Causal/target organism	Targeted gene	Significance	Reference
<i>Triticum aestivum</i>	Powdery mildew disease	<i>Blumeria graminis f. sp. Tritici</i>	TaMLO-A1 (wheat mildew resistance locus1)	Simultaneous modification in three homoeoalleles, heritable broad spectrum resistance to powdery mildew	Wang et al., 2014
<i>Oryza sativa</i>	Bacterial blight of rice	<i>Xanthomonas oryzae</i>	OsSWEET11, OsSWEET14 (rice bacterial blight susceptibility genes)	PEG stimulated Cas9/sgRNA gene uptake in rice protoplast (<i>Agrobacterium</i> independent method), Cas9/sgRNA mutations occur within plant cells, free of bacterial cell involvement	Jiang et al., 2013
	Rice blast disease	<i>Magnaporthe oryzae</i>	OsERF922 (ethylene responsive factor transcription factor)	42% T ₀ mutant lines; 6 T ₂ homozygous mutants showed high blast resistance and have same agronomic traits	Wang et al., 2016
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Turnip mosaic virus disease	<i>Potyvirus</i> (TuMV)	eIF(iso)4E (eIF transcription factor)	Mutants show no growth defects, morphologically similar to wild type	Pyott et al., 2016
<i>Gossypium hirsutum</i>	Cotton leaf curl disease	<i>Begomovirus</i>	CLCuD IR and Rep regions	Targeted cleavage of mixed infections by multiple viruses and associated DNA satellites, such as CLCuD-complex	Iqbal et al., 2016
<i>Cucumis sativus L.</i>	Ring spot disease, vein yellowing disease	<i>Cucumber vein yellowing virus</i> (povovirus), <i>potyviruses Zucchini yellow mosaic virus and Papaya ring spot mosaic virus-W</i>	eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E)	eIF4E disruption generated virus resistant heterozygous non-transgenic mutants	Chandrasekaran et al., 2016
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Leaf thickening, chlorosis, curling	<i>Bean yellow dwarf virus</i> (BeYDV)	BeYDV (short intergenic region, trans acting replication initiation protein)	87% reduction in targeted viral load. Study proved that IR targeting via sgRNA confer better resistance	Baltes et al., 2014
	Leaf curl disease	<i>Tomato yellow leaf curl virus, Beet curly top virus</i>	TYLCSV-IR (intergenic regions), RCA regions	Mutants showed delayed and reduced viral DNA accumulation	Ali et al., 2015

Quelle: Seite 13 in: L. Arora, A. Marula: Gene Editing and Crop Improvement Using CRISPR-Cas9 System; Front. Plant Sci., 8.November 2017; <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01932>.

Im Juli 2018 ist ein Übersichtsartikel mit dem Titel „**CRISPR for Crop Improvement: An Update Review**“ erschienen.²³ In der Einleitung des Artikel heißt es, nach verschiedenen Studien, die prinzipiell eine Durchführbarkeit und Anwendung von CRISPR/Cas in Kulturpflanzen belegten, seien mehrere modifizierte Cas9-Regionen in Kulturpflanzen eingesetzt worden, um die Zielspezifität zu verbessern und die Off-Target-Spaltung zu reduzieren (z.B. Nmcas9, Sacas9 und Stcas9). Darüber hinaus habe die Verfügbarkeit von Cas9-Enzymen aus weiteren Bakterienarten die Möglichkeit eröffnet, die Spezifität und Effizienz von Genbearbeitungsmethoden zu erhöhen. In ihrem Artikel werden die in der Pflanzen-Biotechnologie zur Verfügung stehenden Optionen basierend auf der CRISPR/Cas Technologie zusammengefasst und einzelne Studien angeführt,

23 D. Jaganathan, K. Ramasamy, G. Sellamuthu, S. Jayabalan, G. Venkataraman: CRISPR for Crop Improvement: An Update Review; Front Plant Sci. 2018; 17. Juli 2018; 9:985. doi: 10.3389/fpls.2018.0098 [zuletzt abgerufen am 15. August 2018].

die sich mit der Erhöhung von biotischer und abiotischer Stresstoleranz beschäftigen. Diese bereits durchgeführten Studien werden in einer Tabelle zusammengefasst:

TABLE 4 | Application of CRISPR based genome editing approach in plants for biotic, abiotic, and nutritional traits.

Crop	Method	Target gene	Stress/trait	Reference
Biotic Stress				
<i>A. thaliana</i> / <i>N. benthamiana</i>	NHEJ	dsDNA of virus (A7, B7, and C3 regions)	Beet severe curly top virus resistance	Ji et al., 2015
<i>A. thaliana</i>	NHEJ	<i>eIF(iso)4E</i>	Turnip mosaic virus (TuMV) resistance	Pyott et al., 2016
<i>N. benthamiana</i>	NHEJ	BeYDV	Bean yellow dwarf virus (BeYDV) resistance	Baltes et al., 2015
<i>N. benthamiana</i>	NHEJ	ORFs and the IR sequence sDNA of virus	Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) and Merremia mosaic virus (MeMV)	Ali et al., 2015
Rice	NHEJ	<i>OsERF922</i> (ethylene responsive factor)	Blast Resistance	Wang F. et al., 2016
Rice (IR24)	NHEJ	<i>OsSWEET13</i>	Bacterial blight disease resistance	Zhou et al., 2015
Bread wheat	NHEJ	<i>TaMLO-A1</i> , <i>TaMLO-B1</i> , and <i>TaMLOD1</i>	Powdery mildew resistance	Wang et al., 2014
Cucumber	NHEJ	<i>eIF4E</i> (eukaryotic translation initiation factor 4E)	Cucumber vein yellowing virus (CVYV), Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), and Papaya ring spot mosaic virus type-W (PRSV-W)	Chandrasekaran et al., 2016
Abiotic stress				
Maize	HDR	<i>ARGOS8</i>	Increased grain yield under drought stress	Shi et al., 2017
Tomato	NHEJ	<i>SIMAPK3</i>	Drought tolerance	Wang et al., 2017
<i>A. thaliana</i>	NHEJ	<i>UGT79B2</i> , <i>UGT79B3</i>	Susceptibility to cold, salt, and drought stresses	
<i>A. thaliana</i>	HDR	<i>MIR169a</i>	Drought tolerance	Zhao et al., 2016
<i>A. thaliana</i>	NHEJ	<i>OST2</i> (OPEN STOMATA 2) (AHA1)	Increased stomatal closure in response to abscisic acid (ABA).	Osakabe et al., 2016
Rice	HDR, NHEJ	<i>OsPDS</i> , <i>OsMPK2</i> , <i>OsBADH2</i>	Involved in various abiotic stress tolerance	Shan et al., 2013
Rice	NHEJ	<i>OsMPK5</i>	Various abiotic stress tolerance and disease resistance	Xie and Yang, 2013
Rice	NHEJ, HDR	<i>OsMPK2</i> , <i>OsDEP1</i>	Yield under stress	Shan et al., 2014
Rice	NHEJ	<i>OsDERF1</i> , <i>OsPMS3</i> , <i>OsEPSPS</i> , <i>OsMSH1</i> , <i>OsMYB5</i>	Drought tolerance	Zhang et al., 2014
Rice	NHEJ	<i>OsAOX1a</i> , <i>OsAOX1b</i> , <i>OsAOX1c</i> , <i>OsBEL</i>	Various abiotic stress tolerance	Xu et al., 2015
Rice	NHEJ	<i>OsHAK-1</i>	Low cesium accumulation	Cordones et al., 2017
Rice	NHEJ	<i>OsPRX2</i>	Potassium deficiency tolerance	Mao et al., 2018
Nutritional and other Traits				
Rice	NHEJ	<i>25604 gRNA for 12802 genes</i>	Creating genome wide mutant library	Meng et al., 2017
Maize	NHEJ	<i>ZmIPK1A</i> <i>ZmIPK</i> and <i>ZmMRP4</i>	Phytic acid synthesis	Liang et al., 2014
Wheat	HDR	<i>TaVIT2</i>	Fe content	Connorton et al., 2017
Soybean	NHEJ	<i>GmPDS11</i> and <i>GmPDS18</i>	Carotenoid biosynthesis	Du et al., 2016
Tomato	NHEJ	<i>Rin</i>	Fruit ripening	Ito et al., 2015
Potato	HDR	<i>ALS1</i>	Herbicide resistance	Butler et al., 2016
Cassava	NHEJ	<i>MePDS</i>	Carotenoid biosynthesis	Odipto et al., 2017

Quelle: Seite 9 in: D. Jaganathan, K. Ramasamy, G. Sellamuthu, S. Jayabalan, G. Venkataraman: CRISPR for Crop Improvement: An Update Review; Front Plant Sci. 2018; 17. Juli 2018; 9:985. doi: 10.3389/fpls.2018.0098

Die Autoren schließen ihre Ausführungen mit der folgenden Einschätzung: Neue Züchtungstechniken ermöglichen den Wissenschaftlern, präziser und schneller die gewünschten Eigenschaften in eine Pflanze einzubringen als herkömmliche Zucht. Die CRISPR/Cas9-basierte Methodik ist dabei eine grundlegende bahnbrechende Technik. In der Zukunft werden Genom-editierende

Werkzeuge in Hinblick auf die Verbesserung der Ernte, Ertragssteigerung, Nährwertanpassung und Krankheitsbekämpfung ein bedeutendes Anwendungsfeld sein. In den vergangenen fünf Jahren wurden die Methoden in vielen Ländern mit Blick auf Pflanzensysteme für funktionelle Studien und die Bekämpfung von biotischen und abiotischen Belastungen sowie zur Verbesserung anderer wichtiger agronomischer Eigenschaften eingesetzt. Obwohl bereits mehrere Änderungen an dieser Technologie zur Effizienzsteigerung vorgenommen wurden, müssen die Techniken weiter verbessert werden. Dennoch, so prognostizieren die Autoren, werde die CRISPR/Cas9-basierte Genombearbeitung an Popularität gewinnen und eine essentielle Technik darstellen, um das „Null-Hunger-Ziel“ zu erreichen und dem Wachstum der menschliche Bevölkerung zu begegnen.²⁴

Auch in einer ebenfalls im Juli 2018 erschienenen Arbeit mit dem Titel „**New breeding technique “genome editing” for crop improvement: applications, potentials and challenges**“²⁵ wird das Potenzial neuer Zuchttechniken betont: „Trotz enormer Erfolge in der Pflanzenzüchtung und Transgenese zur Verbesserung der ertragsrelevanten Eigenschaften bei Kulturpflanzen gab es immer wieder Einschränkungen vor allem bei der Spezifität der genetischen Veränderungen und der Unverträglichkeit der Wirtsarten. Neue Züchtungstechniken gewinnen derzeit weltweit an Bedeutung. Unter diesen Techniken stellt das Gene Editing mit Hilfe von zielgerichteter Nukleasen eine wichtige Technik dar, mittels derer bisherige Einschränkungen der klassischen Züchtung und Transgenese überwunden werden können“.²⁶ In einer Tabelle werden potenzielle Zielgene für die Genom-Editierung in einigen ausgewählten Nutzpflanzen wiedergegeben:

24 Übersetzung durch die Autorin der vorliegenden Arbeit.

25 S. B. Aglawe, K. M. Barbadikar, S. K. Mangrauthia; M. S. Madhav: New breeding technique “genome editing” for crop improvement: applications, potentials and challenges; *Biotech* (2018) 8:336; 23. Juli 2018; <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1355-3> [zuletzt abgerufen am 15. August 2018].

26 Übersetzung durch die Autorin der vorliegenden Arbeit.

Table 5 Potential target genes for GE in some important crop plants

Crop	Trait	Gene	References
Rice	Rice blast resistance	WRKY gene 45	Akagi et al. (2014)
Rice	Yield/grain productivity	<i>OsSPL14</i> (squamosa promoter binding protein-Like 14, also known as IPA1)/ <i>OsEBS</i>	Dong et al. (2013)
Rice	Phosphorous use efficiency	<i>Pup-1</i>	Wissuwa et al. (1998, 2002)
Rice	Brown plant hopper resistance	<i>OsLecRK1</i> (lectin receptor kinase)	Ji et al. (2016)
Rice	Cold tolerance	Rice carbon catabolite repressor 4(<i>CCR4</i>)-associated factor 1B	Chou et al. (2014)
Rice	Drought tolerance	<i>osa-miR162</i> , <i>osa-miR164</i>	Fang et al. (2014), Tian et al. (2015)
Rice	Grain size, grain number, grain yield	<i>osa-miR397</i>	Zhang et al. (2013a, b)
Rice	Phosphate starvation response	<i>osa-miR399</i>	Hu et al. (2011, 2015)
Rice	Photoperiod-sensitive male sterility	<i>osa-miR2118</i>	Fan et al. (2016)
Wheat	Gluten content	<i>RabD</i>	Tyler et al. (2015)
Wheat	Disease resistance	Lr34	Krattinger et al. (2016)
Maize	Quality protein maize (QPM)	<i>opaque 2</i>	Mertz et al. (1964)
Maize	Disease resistance	<i>Hm1</i>	Hurni et al. (2015)
Maize	Heat tolerance	Peroxisomal ascorbate peroxidase (<i>TapAPX</i>)	Padaria et al. (2014)
Pearl Millet	Grain quality enhancement/reduction of grain anti-nutritional factors	Phytate, polyphenols, tannins	Vinoth and Ravindran (2017)
Groundnut	Increased content of poly unsaturated fatty acids	<i>FAD2</i>	Janila et al. (2016)
Tomato	Tomato yellow leaf curl virus resistance	<i>Ty-1</i> resistance gene	Butterbach et al. (2014)
Potato	Disease resistance	Potato late blight resistance genes	Jo et al. (2015)
Potato	Quality enhancement	Asparagine synthetase-1 gene	Chawla et al. (2012)
Soybean	Pod shattering resistance	NAC (NAM, ATAF1/2 and CUC2) family genes, SHATTERING1-5 (<i>SHAT1-5</i>)	Dong et al. (2014)
Pegionpea	Sterility Mosaic Disease Resistance	<i>SVI</i>	Daspute et al. (2014)
Pea	Disease resistance	<i>er1</i> (<i>E. pisi</i> resistance)	Fondevilla et al. (2006)
Chickpea	Drought tolerance	<i>ERECTA</i> -like kinase	Varshney et al. (2014)

Quelle: Seite 12 in: S. B. Aglawe, K. M. Barbadikar, S. K. Mangrauthia; M. S. Madhav: New breeding technique “genome editing” for crop improvement: applications, potentials and challenges; *Biotech* (2018) 8:336; 23. Juli 2018; <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1355-3>.

Die Autoren gehen auch auf derzeitige bestehende Probleme bei der Anwendung der Gen-Editierungstechnologie ein:²⁷

- Die Wahrscheinlichkeit, Doppelstrangbrüche und eine nachfolgende Reparatur an beiden Gen-Orten einer Zielregion zu erhalten, ist bei diploiden Pflanzenarten geringer als bei polyploiden. Bei polyploiden Pflanzen ist der Zielort in mehr als zwei Exemplaren vorhanden, in einem solchen Zustand ist es schwieriger, eine homozygote Pflanze für einen veränderten Ort zu erhalten. Um eine homozygote Pflanze für alle Zielorte zu erhalten, muss

27 Seite 16 in: S. B. Aglawe, K. M. Barbadikar, S. K. Mangrauthia; M. S. Madhav: New breeding technique “genome editing” for crop improvement: applications, potentials and challenges; *Biotech* (2018) 8:336; 23. Juli 2018; <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1355-3> [zuletzt abgerufen am 15. August 2018].

nach dem Gene-Editing-Experiment eine große Anzahl von Pflanzenpopulationen untersucht werden. Hierbei ist es wichtig, Einrichtungen für die Hochdurchsatz-Phänotypisierung zu entwickeln, um die Phänotypen von gene-edited Linien zu bewerten.

- Es muss an der Effizienz der Einbringung des genetischen Materials mindestens in wichtige Nutzpflanzen gearbeitet werden.
- Eine weitere Herausforderung im Zusammenhang mit der Toxizität für Zellen besteht in off-target²⁸ Doppelstrangbrüchen, was den umfassenden Einsatz von Nuklease Targeting-Systemen in Pflanzen verhindert.
- Desweiteren plädieren die Autoren dafür, sogenannte „pooled CRISPR libraries“²⁹ einzurichten, die für Pflanzenarten bislang nicht existierten. Mindestens für Modell-Pflanzen wäre diese eine wertvolle Ressource.

3.2. Risiken/ Unbeabsichtigte Effekte

3.2.1. Off-Target Effekte

Sogenannte Off-Target-Effekte werden am häufigsten erwähnt, wenn es um die Diskussion unbeabsichtigter Effekte geht. Off-Target-Effekte sind im Zuge der Anwendung eines Genom-Editing-Verfahrens Auswirkungen, die **nicht an der beabsichtigten Zielposition innerhalb des Genoms** auftreten. Oftmals liegt es daran, dass diese Region eine vergleichsweise große Ähnlichkeit mit der Zielregion aufweist. Entstandene Mutationen können mittels sequenzspezifischer PCR (Polymerase Chain Reaction, siehe oben) oder auch durch vollständige Sequenzierung detektiert werden. Letzteres ist bei höheren Organismen sehr aufwändig. „Bei Verfahren zur Detektion von Off-target-Mutationen durch Genom-Editierung ist anzumerken, dass nur gezielt in Sequenzen gesucht wird, die sehr ähnlich zur Zielsequenz sind. Um diese Off-target-Orte zu bestimmen, werden bioinformatische Vorhersageprogramme genutzt. Diese eignen sich gleichermaßen für Tiere, Pflanzen und Mikroorganismen.“³⁰ Zu Off-targeting in Pflanzen wird im Bericht „Wissenschaftlicher Bericht zu den neuen Techniken in der Pflanzenzüchtung und der Tierzucht und ihren Verwendungen im Bereich der Ernährung und Landwirtschaft“ festgestellt:

„Bei Pflanzen wurden Off-target-Effekte nur in Sequenzen gefunden, die wenige abweichende Basen von der Zielsequenz aufweisen und auch nur dann, wenn diese nicht in der Kernregion der Zielsequenz liegen. Bezogen auf die Genomgröße beträgt die Off-target-Rate beim CRISPR/Cas9 Verfahren z.B. in Reis in einer Sequenz, die sich nur durch eine Base von der Zielsequenz unterscheidet, ca. 3×10^{-10} . In diesem Fall konnte ein Off-target-Ereignis detektiert werden, das in 10 % der Sequenzierungen dieser spezifischen Off-target-Sequenz auftrat. Dieser sehr geringe Anteil

28 Zu Off-Target-Effekten siehe Kapitel 3.2.1.

29 Sog. pooled CRISPR libraries bestehen aus Tausenden Plasmiden (außerhalb der Chromosomen vorkommender Erbräger in Bakterien), die jeweils mehrere gRNAs (Leit-RNAs, engl. für guide RNA) für jedes Zielgen enthalten. In einem CRISPR-Screening-Experiment werden Zielzellen mit der gepoolten Bibliothek behandelt, um eine Population von Mutantenzellen zu erzeugen, die dann auf einen interessanten Phänotyp untersucht werden.

30 Seite 21 in: Bartsch, D. et al.: Wissenschaftlicher Bericht zu den neuen Techniken in der Pflanzenzüchtung und der Tierzucht und ihren Verwendungen im Bereich der Ernährung und Landwirtschaft; überarbeitete Fassung vom 23.02.2018; Forschungsbericht BfR; https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/00_allgemein/Bericht_Neue_Zuechtungstechniken%2023-02-2018.pdf?__blob=publicationFile&v=9 [zuletzt abgerufen am 15. August 2018]

wird sich mit verbesserten oder präziseren DNA-Nukleasen noch weiter reduzieren, z. B. durch Nickasen, HF-SpCas9, eCas9 oder auch Cpf1. Beim TALEN-Verfahren konnten in einer Studie neben der erwarteten Mutation noch drei weitere Deletionen identifiziert werden. Diese befanden sich in Bereichen, die keine Ähnlichkeiten zur Zielsequenz aufweisen. Da die Pflanzen in dieser Studie allerdings Zellkulturpassagen durchliefen, bei denen weitere Mutationen auftreten können, war die Ursache der Deletionen nicht zu ermitteln. Bei ZFN-Verfahren konnten in Pflanzen bisher keine Off-target-Effekte gezeigt werden. Allerdings ist die Datenlage für TALENs und ZFNs deutlich geringer als bei CRISPR/Cas9. In einigen Fällen wurde das gesamte Genom von Pflanzen mittels whole genome sequencing (WGS) sequenziert, um Off-target-Effekte aufzuzeigen, die nicht vorhergesagt wurden. Bisher wurden in keiner dieser Studien Off-target-Effekte detektiert, die eindeutig der verwendeten Technik zugeschrieben werden konnten. Für ODM gibt es bisher keine veröffentlichten Daten zur Off-target-Rate, sie sollte aber auf der verwendeten Technik (kein DNA-Bruch) und des DNA-Reparaturmechanismus (Fehlpaarungsreparatur) im Bereich unter 1 % liegen bezogen auf die Sequenzen, an die das Oligonukleotid überhaupt binden kann. Beim Base Editing unter Verwendung eines inaktiven Cas9 Proteins mit kombinierter Cytosin-Deaminase kann es zu Off-target-Effekten im beschriebenen Fenster von fünf Nukleotiden kommen. Dieses passiert, und zwar genau dann, wenn es auch zur Off-target-Bindung von Cas9 kommt. Da diese Technik bei Pflanzen bisher selten zum Einsatz kam, kann über die absolute Off-target-Rate derzeit keine Aussage getroffen werden. Daten aus *Escherichia coli* deuten allerdings darauf hin, dass zusätzliche Off-target-Effekte möglich sind (Yang et al., 2016). Die in dieser Studie untersuchte Deaminase (Activation Induced Deaminase, AID) zeigte genomweit eine erhöhte Rate an Cytosin-Deaminierung und dies unabhängig von den Fusionsproteinen (Zinkfinger und TALE), die für die Zielsequenzerkennung verwendet wurden.“³¹

3.2.2. Verbleiben von sgRNA-Cas9 Expressionskassette³² in der modifizierten Pflanzen

Die sgRNA (engl. für „single guide“ RNA) ist ein künstlich hergestelltes RNA-Molekül, durch das im CRISPR/CAS System das Cas9-Molekül sequenzspezifisch an seinen Zielort geleitet wird. Das zur Modifikation in die Pflanze eingebrachte Material könnte in der Pflanze verbleiben.³³

3.3. Zum Nachweis des Einsatzes von Genschern

Seit Juli 2017 liegt der „Wissenschaftlicher Bericht zu den neuen Techniken in der Pflanzenzüchtung und der Tierzucht und ihren Verwendungen im Bereich der Ernährung und Landwirtschaft“ der Ressortforschungseinrichtungen Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL); Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR); Thünen-Institut (TI); Max Rubner-Institut

31 Seite 22+23 ebd.

32 DNA-Segment, das für die Herstellung einer RNA verantwortlich ist. Eine solche „Kassette“ besteht aus verschiedenen Elementen, z. B Promotor (essentiell für den Start der Transkription von DNA in RNA) und protein-codierende Region u.a.

33 Siehe hierzu: Seite 10 in: https://www.bmgf.gv.at/cms/home/attachments/2/5/0/CH1052/CMS1493814297724/techniken_pflanzenzuechtung_kurz_20170323.pdf [zuletzt abgerufen am 15. August 2018]

(MRI); Friedrich Löffler-Institut (FLI) und Julius Kühn-Institut (JKI) vor.³⁴ Hiermit sollte eine fundierte Beurteilungsbasis gemäß „Grünbuch Ernährung, Landwirtschaft, Ländliche Räume“ vom Dezember 2016 des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) geschaffen werden.

Hierin heißt es hinsichtlich der Identifizierbarkeit genomeditierter Organismen: „Bei der Analytik von Proben sind zwei Szenarien zu unterscheiden: Der Nachweis der Veränderung kann auf Grundlage vorheriger Kenntnis der Modifikation und der angrenzenden Nukleotidsequenzen (z. B. auf Grundlage von Informationen des Entwicklers, aus Publikationen, Patentschriften etc.) zielgerichtet erfolgen. In diesem Fall wird im Folgenden von zielgerichtetem Nachweis gesprochen. Erfolgt der Nachweis der genetischen Veränderungen dagegen ohne die vorherige Kenntnis der Modifikation und der angrenzenden Nukleotidsequenzen, ist im Folgenden der nicht-zielgerichtete Nachweis gemeint. [...] **Ohne geeignete Referenz sind der Nachweis genetischer Unterschiede und die Identifizierung des genomeditierten Organismus nicht möglich.** Basierend auf den gefundenen genetischen Unterschieden müssen bioinformatische und statistische Analysen genutzt werden, um Abschätzungen zu ermöglichen, ob diese Unterschiede mit großer Wahrscheinlichkeit technologiebedingte genetische Veränderungen sind.“³⁵

34 Bartsch, D. et al.: Wissenschaftlicher Bericht zu den neuen Techniken in der Pflanzenzüchtung und der Tierzucht und ihren Verwendungen im Bereich der Ernährung und Landwirtschaft; überarbeitete Fassung vom 23.02.2018; Forschungsbericht BfR; https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/00_allgemein/Bericht_Neue_Zuechtungstechniken%2023-02-2018.pdf?__blob=publicationFile&v=9 [zuletzt abgerufen am 15. August 2018]

35 Ebd. Seite 47.