

Neue Nachweismethode verspricht spezifische Detektion genom-editierter Rapslinien – was kann das Verfahren tatsächlich leisten?

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit bewertet Veröffentlichung

09.09.2020

Scroll down for English version

In einem Artikel der Fachzeitschrift *Foods* vom 07.09.2020 (Chhalliyil et al. 2020, nachfolgend „Artikel“¹) wird eine Nachweismethode für in den USA von der Firma Cibus US LLC vermarktete herbizidtolerante Rapslinien vorgestellt, die nach Auslegung der Autoren mit Einsatz der Oligonukleotid-gesteuerten Mutagenese (ODM) erzeugt sein sollen. Die Autoren stellen heraus, dass sie erstmalig eine spezifische Nachweismethode für eine Pflanze beschreiben, die mit neuen genomischen Techniken (Genom-Editierung) verändert wurde. Als methodischer Ansatz wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) gewählt. Auch in der EU gültige Anforderungen an Identifizierungs- und Nachweisverfahren für die Kontrolle genetisch veränderter Lebensmittel und Futtermittel seien mit diesem PCR-Verfahren erfüllbar. Die wissenschaftliche Veröffentlichung wurde vom Verband Lebensmittel ohne Gentechnik (VLOG), Greenpeace und weiteren Verbänden finanziert.

Das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) hat die Veröffentlichung des Artikels sorgfältig geprüft und kommt zu folgender Bewertung:

Zusammenfassung

Unter dem Begriff „Cibus-Raps“ lassen sich mehrere herbizidtolerante Rapslinien zusammenfassen, die mittels Genom-Editierung oder herkömmlicher Züchtungsmethoden entstanden sind. Das im Artikel beschriebene Verfahren ist für den Nachweis einer bestimmten Punktmutation in der Erbinformation (dem Genom) von bestimmten Rapslinien entwickelt worden. Sowohl neue züchterische Verfahren, wie die Genom-Editierung, klassische Züchtungsverfahren als auch zufällige biologische Prozesse während der Zellkultur von Rapspflanzen können die Ursache einer solchen Mutation sein. Nach vorliegender Informationslage kommt das BVL zu der Einschätzung, dass die im Artikel betrachtete Punktmutation nicht durch Genom-Editierung-Verfahren entstanden ist. Das im Artikel beschriebene Verfahren kann spezifisch diese Mutation nachweisen. Es kann aber nicht identifizieren, ob sie in einer der Rapslinien tatsächlich durch Genom-Editierung entstanden ist. Ein gerichtsfester Befund bei amtlichen Kontrollen von Lebensmitteln und Futtermitteln auf unbeabsichtigte Anteile von GVO ist daher mit dieser Methode alleine nicht möglich.

Im Einzelnen:

a) Angaben zum Untersuchungsmaterial widersprechen der Herkunft aus einer Genom-Editierung.

In dem Artikel wird angegeben, dass die von den Autoren im Handel gekauften und anschließend untersuchten Rapslinien (C1511, C5507 und 40K) mit Genom-Editierung (ODM) erzeugt wurden. Als Referenz wird eine veröffentlichte Bewertung der kanadischen Gesundheitsbehörde ([Health Canada](#)) von 2016 zitiert². Nach Angaben der Autoren sollen die drei untersuchten Rapslinien von der Rapslinie 5715 abstammen.

ODM wird in der Veröffentlichung von Health Canada im Zusammenhang mit der Rapslinie 5715 zwar erwähnt, aber nicht zwingend mit der von den Autoren untersuchten Punktmutation in Zusammenhang gebracht. Eine zuvor im Jahr 2013 veröffentlichte Stellungnahme der kanadischen Zulassungsbehörde (Canadian Food Inspection Agency)³ beschreibt die in Frage stehende Mutation bereits als spontan und nicht durch ODM entstanden. In Bezug auf die Punktmutation gab die Firma Cibus US LLC bei den kanadischen Behörden ebenfalls an, dass diese das Ergebnis einer spontanen Mutation (somaklonalen Variation) ist, die während des Gewebekulturprozesses auftrat, und nicht auf die ODM-Technik zurückgeht. Die Rapslinie ist eine Kreuzung aus einer mittels konventionellen Züchtungstechniken erzeugten Rapslinie (Clearfield Canola Varietät SP Cougar CL) und der Linie BnALS-57. Die Linie BnALS-57 ist zusammenfassend zwar im Rahmen einer gentechnischen Arbeit entstanden, bei der ODM als Genom-Editierung-Verfahren angewandt wurde, die im Artikel betrachtete Mutation geht aber nicht auf ODM zurück. Um diesen komplexen Sachverhalt für die Öffentlichkeit nachvollziehbar bereitzustellen, wurden die hier genannten Informationen über die Rapslinie 5715 in die EUginius-Datenbank aufgenommen⁴.

Aufgrund vorliegender Informationen des Herstellers (siehe Webseite der Firma Cibus US LLC, Stand 08.09.2020) sind die zurzeit in den USA vermarkteten, Sulfonylurea-toleranten FalcoTM-Rapsorten mit traditionellen Züchtungsmethoden entwickelt worden⁵. Daraus schließt das BVL, dass die im Artikel dargestellte Nachweismethode zwar in der Lage ist, herbizidtolerante Rapslinien mit einer spezifischen Punktmutation zu detektieren, aber nicht spezifisch unterscheiden kann, ob die nachgewiesene Mutation einer Rapslinie zuzuordnen ist, die mithilfe von ODM erzeugt wurde. Es handelt sich bei dem Artikel also um eine Methodenentwicklung, die zwar Mutationen nachweisen kann, nicht aber unterscheiden kann zwischen züchterisch unterschiedlich hergestellten Rapslinien.

b) Kein Identifikationsverfahren für Genom-Editierung

Durch Gewebekultur erzeugte Mutationen gelten auch nach dem [EuGH-Urteil](#) vom 25.07.2018⁶ nicht als Gentechnik. Aufgrund der bisher vorliegenden Informationen geht das BVL davon aus, dass die nachweisbare Punktmutation nicht mit einem Genom-Editierung-(ODM-)Verfahren erzeugt wurde.

Bei Anwendung neuer genomischer Techniken wie CRISPR/Cas oder auch ODM wird im Gegensatz zu den bisher eingesetzten Gentechniken in der Regel keine artfremde Erbanlage (Fremd-DNA) in das Genom der Pflanzen eingebaut. Das hat zur Folge, dass die Identifikation genomeditierter Pflanzen mit nur einer Punktmutation nicht mittels üblicher Event-spezifischer PCR-Verfahren, die auf den Übergang vom pflanzlichen Genom in die eingebaute Fremd-DNA basieren, möglich ist. Der spezifische Nachweis einer Punktmutation ist seit Jahrzehnten technisch möglich und stellt keine Neuheit für die Wissenschaft dar. In mehreren Veröffentlichungen zu Möglichkeiten und Limitierungen der Nachweis- und Identifizierbarkeit genomeditierter Pflanzen wurde klar herausgestellt, dass die Herausforderung eben nicht im Nachweis einer Punktmutation besteht. Vielmehr besteht die Schwierigkeit darin, mit neuen genomischen Techniken entwickelte Organismen eindeutig zu identifizieren und analytisch belegen zu können, dass die Veränderungen durch Genom-Editierung erzeugt wurden⁷⁻¹⁰.

c) Analytik zum Nachweis der Punktmutation ist valide, reicht aber nicht zur Identifizierung genomeditierter Rapslinien aus

Die technische Bewertung des Artikels ergibt, dass die Leistungsparameter des Verfahrens zur Sensitivität und Quantifizierbarkeit korrekt bestimmt wurden. Der beschriebene PCR-Nachweis der Punktmutation in Rapslinien stellt ein valides Verfahren dar. Allerdings, kann, anders als von den Autoren angeführt, die Methode nicht gerichtsfest nachweisen, wie die Punktmutation entstanden ist, d.h. ob durch Einsatz von Genom-Editierung, durch anderen technischen Verfahren oder durch spontane natürliche Mutation. Der Artikel zeigt zudem keine Lösung dazu auf, wie generell eine mit Genom-Editierung erzeugte Punktmutation nachgewiesen werden kann, wenn der Hersteller

d) Anstrengungen des BVL und des JKI zur Lösung der Identifikationsproblematik

Die Firma Cibus US LLC hatte in einem Feststellungsverfahren beim BVL im Jahr 2015 klären lassen, ob Punktmutationen, wenn sie durch Genom-Editierung (hier ODM) erzeugt würden, einer gentechnikrechtlichen Zulassung unterliegen. Der EuGH hat am 25.07.2018 entschieden, dass mit ODM, nicht aber mit herkömmlichen Mutageneseverfahren erzeugte Pflanzen dem europäischen Gentechnikrecht unterliegen.

Zur genannten Problematik des Nachweises und der Identifikation wurde im Jahr 2019 ein Pilotprojekt am Beispiel von Rapslinien (Versuchslinien) in einer Arbeitsgruppe des Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit begonnen, für die geeignete und gut charakterisierte Referenzmaterialien zur Verfügung stehen. Diese Linien weisen eine identische Punktmutation auf, wobei diese entweder durch herkömmliche Mutagenese (somaklonale Variation) oder durch Genom-Editierung erzeugt wurde. Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass mit der gängigen PCR-Methode die Nachweisbarkeit, nicht aber die Unterscheidbarkeit dieser Linien möglich ist und somit auch die jeweilige Herstellungsweise nicht identifiziert werden kann. Das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) hat zur Intensivierung der wissenschaftlichen Forschungsarbeit hinsichtlich der Problematik, mit fachlicher Beratung des BVL und des Julius Kühn-Instituts, ein Forschungsvorhaben zu dem Thema „Machbarkeitsstudie zu Nachweis- und Identifizierungsverfahren für genomeditierte Pflanzen und pflanzliche Produkte“ ausgeschrieben. Hierbei soll vertieft der beschriebenen Fragestellung nachgegangen und im praktischen Ansatz fokussiert überprüft werden, inwiefern für amtliche Kontrollen von Lebensmitteln und Futtermitteln gerichtsfeste Nachweis- und Identifizierungsverfahren entwickelt werden können.

Das Nationale Referenzlabor für GVO, das am Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit angesiedelt ist, wird die in dem Artikel beschriebene Nachweismethode hinsichtlich der Leistungseigenschaften anhand vorliegender Referenzmaterialien in der Anwendung prüfen.

Referenzen:

1. Chhalliyil, P.; Ilves, H.; Kazakov, S.A.; Howard, S.J.; Johnston, B.H.; Fagan, J. (2020). A Real-Time Quantitative PCR Method Specific for Detection and Quantification of the First Commercialized Genome-Edited Plant. *Foods*. 9:1245.
2. Health Canada Novel Food Information, <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/genetically-modified-foods-other-novel-foods/approved-products/novel-food-information-cibus-canola-event-5715-imidazolinone-sulfonylurea-herbicide-tolerant.html>
3. DD 2013-100: Determination of the Safety of Cibus Canada Inc. (Incorporated)'s Canola (Brassica napus L. (Linnaeus)) Event 5715, <https://www.inspection.gc.ca/plant-varieties/plants-with-novel-traits/approved-under-review/decision-documents/dd-2013-100/eng/1427383332253/1427383674669>
4. https://euginius.eu/euginius/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=5715
5. <https://www.falcoseed.com/technology>
6. Urteil des Europäischen Gerichtshofs (Große Kammer) vom 25. Juli 2018 in der Rechtssache C-528/16, <http://curia.europa.eu/juris/document/document.jsf?text=&docid=204387&pageIndex=0&doclang=DE&mode=lst&dir=&occ=first&part=1&cid=929085#download=1>
7. Wissenschaftlicher Bericht der Ressortforschungseinrichtungen BVL, JKI, FLI, TI, MRI und BfR im Auftrag des BMEL, <https://www.bmel.de/DE/themen/landwirtschaft/gruene-gentechnik/neue-molekularbiologische-techniken.html>
8. European Network of GMO Laboratories (ENGL) Detection of Food and feed Plant Products obtained by new Mutagenesis Techniques (2019), <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/ENGL/ENGL.html>

9. Grohmann L.; Keilwagen J.; Duensing N.; Dagand E.; Hartung F.; Wilhelm R.; Bendiek J.; Sprink T. (2019) Detection and Identification of Genome Editing in Plants: Challenges and Opportunities. *Front Plant Sci.* 10:236.
10. Broll H.; Braeuning A.; Lampen A. (2019). European Court of Justice decision for genome editing: Consequences on food/feed risk assessment and detection. *Food Control.* 104:288.



Novel detection method makes promises towards the specific detection of genome edited canola lines – what is really achievable by the new method?

A publication in the scientific journal *Foods* dated 07.09.2020 (Chhalliyil et al. 2020, “the article”¹ hereinafter) presents a detection method specific for a herbicide-tolerant canola traded in the US by Cibus US LLC and that was, according to the authors of the article, produced by oligonucleotide-directed mutagenesis (ODM). The authors emphasize that they describe a specific method to detect a plant developed using novel genomic techniques (genome editing) for the first time. As part of the method strategy, the polymerase chain reaction (PCR) was used. The Authors further claim that this PCR based method meets all EU requirements for detection and identification methods requested for the control of genetically engineered food and feed. The scientific publication was funded by the German consumer organization “Lebensmittel ohne Gentechnik (VLOG)”, Greenpeace and other organizations.

The Federal Office of Consumer Protection and Food Safety thoroughly reviewed this article and came to the following conclusions:

Summary

The term “Cibus Canola“ comprises various herbicide tolerant plants which were created either by genome editing or by conventional breeding methods. The method as described in the article was developed for the detection of a specific point mutation in the genome of certain canola lines. New breeding methods such as genome editing as well as classical breeding and random biological processes during tissue culture cultivation of canola plants can all be the cause of such a mutation. Based on the information available, BVL concludes that the very point mutation described in this article was, in fact, not caused by a genome editing technique. The method described in the article can specifically detect this mutation. However, it cannot identify whether or not the mutation was induced in this canola line by genome editing. Therefore, based on food and feed regulations, unassailable evidence cannot be presented in a court of law for the identification of a gene edited canola plant, using this method in isolation.

In detail:

a) Information on the analysed material is contradictory to the alleged genome editing based provenance

The article states that canola lines C1511, C5507 and 40K as purchased and examined by the authors were produced using genome editing (ODM as technique). As a reference, the authors cite a published opinion of the Canadian health authorities (Health Canada) dated 2016². According to the authors, all three canola lines analysed are derived from canola line 5715.

In fact, ODM is mentioned in said opinion of Health Canada as part of the scientific description of canola line 5715. However, it makes no direct link to the point mutation studied by the authors. Yet another opinion of the Canadian competent authorities (Canadian Food Inspection Agency)³, published as early as 2013, describes the mutation studied in the article as being a spontaneous mutation and not

BVL - Fachmeldungen - Neue Nachweismethode verspricht spezifische ... https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Fachmeldungen/06_gentechnik/20...
being caused by ODM. Likewise, Cibus US LLC stated to the Canadian Authorities that the mutation in fact is the result of a spontaneous mutation (somaclonal variation) which appeared during the tissue culturing processing, and which is not caused by the ODM technique. Canola line 5715 is a cross between a conventionally produced canola line (Clearfield Canola Variety SP Cougar CL) and the line BnALS-57. Line BnALS-57, in fact, was produced within the framework of a genetic engineering project which used ODM as a genome editing tool. The mutation studied in the article, however, does not originate from ODM. In order to provide transparent information on this very complex matter to the public, BVL decided to include the information on canola line 5715 in the database EUgenius⁴.

Based on existing information of the manufacturer (see internet presentation of Cibus US LLC, dated 8 September 2020) sulfonylurea-tolerant FalcoTM-canola lines, as presently traded in the US, are produced using conventional breeding methods⁵. From this information BVL concludes that, while the detection method presented in the article is able to detect herbicide tolerant canola lines displaying a certain point mutation, it cannot discriminate specifically whether or not the detected point mutation can be assigned to a canola line produced using ODM. It follows that the article describes a method to detect mutations, but not a method to discriminate between canola lines originating from the application of different breeding techniques.

b) No method for identification of genome editing in plants

Even after the ruling of the European Court of Justice (ECJ) dated 25 July 2018⁶, mutations caused by tissue culture are not legally considered genetic engineering. Based on the information given, BVL assumes that the point mutation mentioned in the article was not produced by genome editing technology (ODM).

In contrast to conventional genetic engineering, with the application of novel genomic techniques like CRISPR/Cas or ODM there usually is no insertion of foreign DNA into the genome of a plant. As a consequence, the identification of genome edited plants with just a point mutation is not possible using conventional event-specific methods that rely on the specific border sequence between the plant genome and the inserted foreign DNA. The detection of a specific point mutation has been technically possible for decades now and per se does not represent a novelty for science. Various publications on the possibilities and limitations of detection and identification methods clearly pointed out the fact that the real challenge is not the detection of a point mutation. Rather, the real challenge is the identification of organisms created with novel genomic techniques and to analytically prove that the mutations were indeed caused by genome editing⁷⁻¹⁰.

c) The analytics for the detection of a point mutation as presented in the article are valid, but not sufficient to identify genome edited canola

The technical evaluation of the article confirms that all parameters on sensitivity and quantification have been accurately described by the authors. The PCR-method presented is a valid method for the detection of a point mutation in a canola line. However, and contradictory to the authors' statement, this method cannot give unassailable court-proof evidence on how the mutation was created, i.e. by means of applying genome editing, by other technical means or by spontaneous natural mutation. In addition, the article does not provide any strategy on how to detect a genome edited-based mutation, if the manufacturer or breeder do not supply any information or a publication.

d) Efforts of BVL and Julius Kühn-Institut (JKI) to solve the problem of identification

In 2015, Cibus US LLC demanded a legally binding assessment of BVL to clarify whether point mutations, if created by genome editing (ODM in this case) would fall under the genetic engineering regulation. On 25 July 2018, ECJ decided in its ruling that, other than plants created by conventional methods of mutagenesis, plants modified by ODM are subjected to European genetic engineering law.

In 2019, a working group within BVL started a pioneering project to clarify the problem of detection and identification using canola lines

BVL - Fachmeldungen - Neue Nachweismethode verspricht spezifische ... https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Fachmeldungen/06_gentechnik/20...
(experimental lines). For these lines, appropriate and well characterized reference material is available. These lines contain an identical point mutation but, whilst in some of the lines this mutation was created by conventional mutagenesis (somaclonal variation), in others the same mutation was caused by genome editing. Preliminary results indicate that with the customary PCR method the detection, but not the differentiation of these lines is possible. Therefore, the way these lines were produced could not be identified. In order to foster scientific research on this problem, the Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) in conjunction with BVL and JKI has launched a call on a scientific research project featuring a "feasibility study on detection and identification methods for genome edited plants and plant products". The study aims to investigate the problem described above in more detail and shall further evaluate if and how evidence presented in a court of law for methods for detection and identification can be established for official controls of food and feed.

The national reference laboratory on GMOs which is located within the BVL, will test the method described in the article regarding its performance characteristics using available reference material.

References:

1. Chhalliyil, P.; Ilves, H.; Kazakov, S.A.; Howard, S.J.; Johnston, B.H.; Fagan, J. (2020). A Real-Time Quantitative PCR Method Specific for Detection and Quantification of the First Commercialized Genome-Edited Plant. *Foods*. 9:1245.
2. Health Canada Novel Food Information, <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/genetically-modified-foods-other-novel-foods/approved-products/novel-food-information-cibus-canola-event-5715-imidazolinone-sulfonylurea-herbicide-tolerant.html>
3. DD 2013-100: Determination of the Safety of Cibus Canada Inc. (Incorporated)'s Canola (Brassica napus L. (Linnaeus)) Event 5715, <https://www.inspection.gc.ca/plant-varieties/plants-with-novel-traits/approved-under-review/decision-documents/dd-2013-100/eng/1427383332253/1427383674669>
4. https://euginius.eu/euginius/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=5715
5. <https://www.falcoseed.com/technology>
6. Urteil des Europäischen Gerichtshofs (Große Kammer) vom 25. Juli 2018 in der Rechtssache C-528/16, <http://curia.europa.eu/juris/document/document.jsf?text=&docid=204387&pageIndex=0&doclang=DE&mode=lst&dir=&occ=first&part=1&cid=929085#download=1>
7. Wissenschaftlicher Bericht der Ressortforschungseinrichtungen BVL, JKI, FLI, TI, MRI und BfR im Auftrag des BMEL, <https://www.bmel.de/DE/themen/landwirtschaft/gruene-gentechnik/neue-molekularbiologische-techniken.html>
8. European Network of GMO Laboratories (ENGL) Detection of Food and feed Plant Products obtained by new Mutagenesis Techniques (2019), <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/ENGL/ENGL.html>
9. Grohmann L.; Keilwagen J.; Duensing N.; Dagand E.; Hartung F.; Wilhelm R.; Bendiek J.; Sprink T. (2019) Detection and Identification of Genome Editing in Plants: Challenges and Opportunities. *Front Plant Sci*. 10:236. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00236/full>
10. Broll H.; Braeuning A.; Lampen A. (2019). European Court of Justice decision for genome editing: Consequences on food/feed risk assessment and detection. *Food Control*. 104:288.

Ausgabejahr 2020

Datum 09.09.2020

Pressekontakt

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)

_____ Berlin

Telefon: _____ • Fax: _____

E-Mail Adresse: _____@bvl.bund.de