

# Analytik II

# **Sicherheitsforschung bei gentechnisch veränderten Pflanzen, Validierung molekularer Nachweissysteme**

**Annette Block**

**Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,**

**85764 Oberschleißheim**

## **Einleitung**

Das Projekt ‚Sicherheitsforschung bei gentechnisch veränderter Pflanzen: Ergebnisse, Optimierung und Validierung molekularer Nachweissysteme‘ finanziert vom Bayerischen Umweltministerium, hatte zum Ziel wichtige Einflussfaktoren auf das Quantifizierungsergebnis GVP (gentechnisch veränderten Pflanzen)-haltiger Praxisproben im Maisanbau zu identifizieren. In Hinsicht der z.T. widersprüchlichen Resultate des Erprobungsanbaus der 2004/ 2005 wurden die Beprobungs- und Analysestrategien näher betrachtet.

In Kooperation des Bayerischen Landesamts für Landwirtschaft (LfL) und mit dem Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung der TUM Weihenstephan wurden Maispflanzen der gentechnisch veränderten (gv-) MON810 Linie in drei Sorten sowie ihre isogenen Sorten vorwiegend im Gewächshaus angezogen und gezielt Kreuzungen vorgenommen. Die Kreuzungen im Gewächshaus dienten dazu den Transgenanteil im Maiskorn zu untersuchen, der sich nicht allein durch die Mendelschen Regeln beschreiben lässt und hierbei den Einfluss der Sorten zu verifizieren. Mit Hilfe von Einzelkornuntersuchungen kann der gv-Gehalt und daraus abgeleitet, der DNA-Gehalt der einzelnen Korngewebe bestimmt werden. Die Bedeutung dieses mathematischen Zusammenhangs wird durch das vermehrte Auftreten von ‚stacked events‘ zukünftig zunehmen, da diese nur via Einzelkornanalysen identifiziert werden können.

Zur praxisnahen Simulation der Ernte, konnte 2007 ein MON810 Versuch der LfL mit genutzt werden (Gruber 2009) um Kreuzungen im Freiland durchzuführen. Dabei wurde der GVP-Gehalt von Körnermais, Lieschen und Silomais in den verschiedenen Maisgeweben und zu verschiedenen praxisrelevanten Erntezeitpunkten verglichen und zueinander ins Verhältnis gesetzt.

Für die Quantifizierung des GVP-Anteils via Real Time PCR kamen verschiedene genomische und plasmidale Kalibrierstandards zum Einsatz und wurden hinsichtlich ihrer Qualität verglichen.

### **Transgenanteil von Maiskörnern bei Einkreuzungen**

Die Gewebefractionen des Maiskorns setzen sich aus Endosperm, Embryo und Perikarp zusammen. Im Gegensatz zum Endosperm und Embryo besteht das Perikarp aus rein mütterlichem Gewebe und entspricht damit dem Transgenanteil der Mutterpflanze auf welcher der Samen heranwächst. Die Gewebe Endosperm und Embryo wurden vom Pollen befruchtet und enthalten ebenfalls das Genom der Vaterpflanze.

Diese Maiskorngewebe variieren hinsichtlich ihrer relativen Masse, ihres DNA-Gehaltes, ihres Ploidiestatus und bei GVP-Samen folglich auch ihres Transgenanteils. Zur systematischen Untersuchung dieser Zusammenhänge wurden Sorten der insektenresistenten MON810 Linie und ihre isogenen Sorten verschiedener Züchter miteinander gekreuzt und Körner der Filialgeneration ( $F_{Nr.}$ ) einer Real Time PCR Einzelkornanalyse unterzogen.

Für die Kreuzungen standen die MON810 Linien 'Kuratus' ('Gavott'), 'DKC3421YG' ('DKC3420') und 'PR39F56' ('PR39F58') der drei Züchtungsunternehmen KWS, Monsanto und Pioneer sowie ihre isogenen Linien (in Klammern) zur Verfügung.

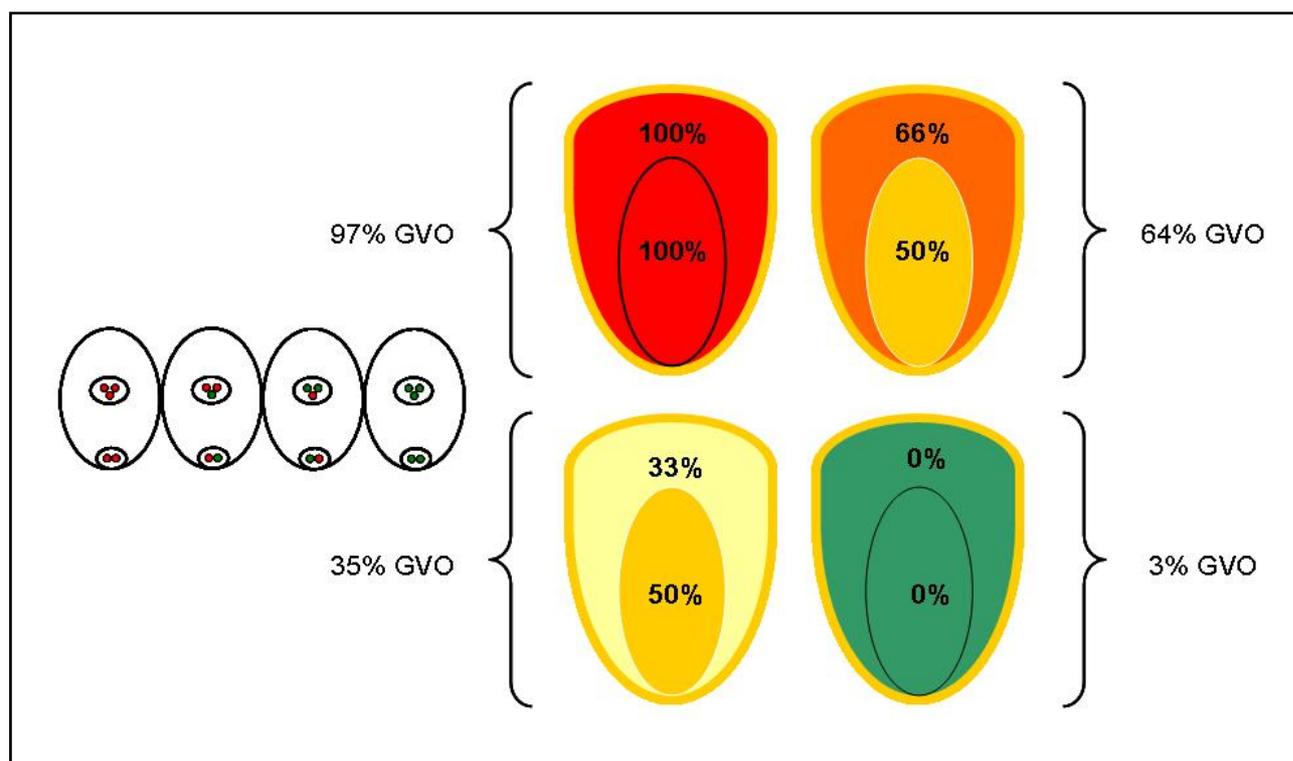
**Tabelle 1:** Kreuzungen von MON810 Sorten und ihren isogenen Linien mit den erwarteten gv-Anteilen der Körner basierend auf die Massenanteile der Korngewebe

Züchter	Anzahl	Mutter ♀	Vater ♂	Erwarteter GVO-Anteil entsprechend Massenanteil
<b>KWS</b>	20	<i>Gavott</i>	<b>Kuratus</b>	0% + 32%
	20	<b>Kuratus</b>	<b>Kuratus</b>	3% + 35% + 64% + 97%
<b>Monsanto</b>	39	<i>DKC3420</i>	<b>Kuratus</b>	0% + 32%
	20	<i>DKC3420</i>	<b>PR39F56</b>	0% + 32%
	19	<i>DKC3420</i>	<b>DKC3421<sup>YG</sup></b>	0% + 32%
	36	<b>DKC3421<sup>YG</sup></b>	<i>Gavott</i>	3% +64%
	19	<b>DKC3421<sup>YG</sup></b>	<i>PR39F58</i>	3% +64%
	20	<b>DKC3421<sup>YG</sup></b>	<b>DKC3421<sup>YG</sup></b>	3% + 35% + 64% + 97%
<b>Pioneer</b>	40	<i>PR39F58</i>	<b>Kuratus</b>	0% + 32%
	19	<i>PR39F58</i>	<b>PR39F56</b>	0% + 32%
	19	<i>PR39F58</i>	<b>DKC3421<sup>YG</sup></b>	0% + 32%
	37	<b>PR39F56</b>	<i>Gavott</i>	3% +64%
	19	<b>PR39F56</b>	<i>DKC3420</i>	3% +64%
	18	<b>PR39F56</b>	<b>PR39F56</b>	3% + 35% + 64% + 97%

Schriftfarbe: **fett** = transgene MON810-Sorten; *kursiv* = konventionelles isogene Sorten

Die MON810 Sorten wurden geselbstet (F<sub>2</sub>) bzw. mit ihren konventionellen Ausgangssorten gekreuzt. Zudem erfolgten Kreuzungen zwischen den Sorten der Züchtungsunternehmen. Mit dieser Strategie können auch Variationen zwischen den Sorten erkannt werden (Tabelle 1).

Das Perikarp einer hemizygoten Mutterpflanze entspricht dem Genotyp der Mutter und ist immer zu 50% transgen. Die bei der Befruchtung entstehenden diploiden Embryonen spalten hingegen entsprechend der Mendelschen Regeln für F<sub>2</sub>-Generationen im Verhältnis von 1:2:1 für homozygot konventionell (0% transgen), hemizygot GVP (50% transgen) und homozygot GVP (100% transgen) auf. Ähnlich verhält es sich beim Endosperm, dass zwei transgene oder konventionelle Genome der Mutter enthält und nach der Befruchtung mit einem hemizygoten Vater triploid ist mit 0%, 33%, 66% oder 100% Transgenanteil.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der vier Genotypen von Maissamen hemizygoter gv-Mutterpflanzen (F<sub>2</sub>-Generation); Links im Bild: Darstellung der vier möglichen Eizellen (diploid, unten) und Embryosackmutterzellen (triploid, oben), rot = transgenes Genom, grün, konventionelles Genom; Rechts im Bild: Maissamen mit 50% transgenem Perikarp (außen, hell-orange), davon links oben 97% gv-Samen (rot, 100% gv-Embryo & Endosperm), rechts oben 64% gv-Samen (hell/ dunkel orange 50% gv-Embryo / 66% gv-Endosperm), links unten 35% gv-Samen (orange 50% gv-Embryo/ gelb 33% gv-Endosperm), rechts unten 3% gv-Samen (grün, 0% gv-Embryo & Endosperm).

Betrachtet man Endosperm und Embryo gemeinsam ergibt sich eine 1:1:1:1 Aufspaltung wie bereits von Kruse (2002) beschrieben. Auf Grundlage der Massenanteile der Gewebe leitete Papazova et al. (2005) die möglichen Transgenanteile der F<sub>2</sub>-Samen ab (siehe Abbildung 1).

Der Transgenanteil des Samens muss jedoch nicht dem Massenanteil der Gewebe im Maiskorn entsprechen, da diese Gewebe Zellen einer unterschiedlichen Größe und Anzahl besitzen, können sie in ihrem DNA-Gehalt erheblich variieren. Zudem sind sie möglicherweise der DNA-Extraktion nicht gleich zugänglich. In diesem Projekt wurde daher der extrahierbare DNA-Anteil über die Messung des GVP-Anteils bestimmt.

Hierzu wurde die mathematische Ableitung von Holst-Jensen et al. (2006) verwendet (Abbildung 2). Diese Formel beschreibt die Errechnung der Häufigkeit (Symbol ‚F‘) eines GVP-Events (Symbol ‚+‘) im haploiden Genom (Symbol ‚n‘) des Samens (Symbol ‚T‘) in Bezug zu den betrachteten Korngeweben (Symbol für jedes Gewebe (A, B, C...K, bzw. a, b, c...k als Indizes für dessen Häufigkeit). Wobei der Transgenanteil der Korngewebe ( ${}^aF_{n+}$ ,  ${}^bF_{n+}$ ,  ${}^cF_{n+}$ ..... ${}^kF_{n+}$ ) mit dem relativen Anteil dieser Gewebe (% von A, B, C....K) multipliziert wird, und zur Summe der Gewebe in Bezug gesetzt wird (A+B+C...+K).

$${}^T F_{n+} = \frac{(A \times {}^a F_{n+}) + (B \times {}^b F_{n+}) + (C \times {}^c F_{n+}) + \dots + (K \times {}^k F_{n+})}{(A + B + C + \dots + K)}$$

**Abbildung 2:** Beziehung zwischen Gewebeanteilen im Korn und Transgenanteil

Diese Formel ist daher für diploide Pflanzen ebenso anwendbar wie für Polyploide und für ein integriertes GVP-Event ebenso wie für mehrere („stacked genes“). Die Ergebnisse der Einzelkornuntersuchungen zeigt Tabelle 2. Entsprechend der ISO 21570 wurde für die Real time PCR Quantifizierung ein Event spezifische PCR-Assay [1] in Kombination mit einem Assay für das *hmgA* ‘house keeping’ Maisreferenzgenen [2] verwendet.

Die Ergebnisse der Einzelkornquantifizierung sind in Tabelle 2 dargestellt. Es wurden pro Kreuzungsvariante immer 20 Körner verarbeitet. Aufgrund der Aufspaltung der Filialgeneration ließen sich die Transgenanteile nicht vorher sagen und sind daher nicht gleichmäßig verteilt (siehe Zahl in Tabelle 2). Da die Mutterpflanze den größten Effekt auf die Entwicklung des Samens haben wurden die Kreuzungen in Tabelle 2 nach dem Züchter der Muttersorte gegliedert und berechnet.

Es zeigt sich, dass die Mittelwerte der Kreuzungen innerhalb einer Muttersorte des gleichen Züchtungsunternehmens sich kaum unterscheiden. Auch die Mittelwerte der Mutterlinien aller drei Züchter liegen sehr nah zusammen. Dies wird auch durch die Standardabweichungen bestätigt, die innerhalb der Kreuzungen einer Muttersorte genauso niedrig sind wie zwischen den Kreuzungen verschiedener Mutterlinien. Bei den drei untersuchten MON810-Sorten und ihren isogenen Sorten sind daher keine sortenbedingten Differenzen in den Transgenanteilen nachweisbar.

**Tabelle 2:** GVP-Anteile in Einzelkörnern von MON810-Sorten und ihren isogenen Sorten

♀ Mutter x ♂ Vater	Zahl	GVO-Anteil (Mittelwert / Standardabweichung)					
<i>DKC3420</i> <b>DKC3421<sup>YG</sup></b>	17-2			43% (2,6%)	0,0% (0,1%)		
<i>DKC3420</i> <b>Kuratus</b>	25-14			44% (5,5%)	0,0% (0,0%)		
<i>DKC3420</i> <b>PR39F56</b>	11-9			40% (2,2%)	0,0% (0,0%)		
<b>DKC3421<sup>YG</sup></b> <i>Gavott</i>	20-14		64% (2,8%)		3,0% (0,4%)		
<b>DKC3421<sup>YG</sup></b> <i>PR39F58</i>	12-8		68% (3,6%)		3,5% (0,9%)		
<b>DKC3421<sup>YG</sup></b> <b>DKC3421<sup>YG</sup></b>	2-4-6-8	96% (0,9%)	63% (4,5%)	43% (2,8%)	3,2% (0,9%)		
<b>Sorten von Monsanto</b>		<b>96% (0,9%)</b>	<b>66% (3,7%)</b>	<b>43% (2,8%)</b>	<b>3,2% (0,7%)</b>	<b>42% (7,2%)</b>	<b>0,0% (0,0%)</b>
<i>PR39F58</i> <b>DKC3421<sup>YG</sup></b>	11-8			43% (2,7%)	0,0% (0,0%)		
<i>PR39F58</i> <b>Kuratus</b>	23-17			45% (3,4%)	0,0% (0,0%)		
<i>PR39F58</i> <b>PR39F56</b>	13-6			43% (4,6%)	0,0% (0,0%)		
<b>PR39F56</b> <i>Gavott</i>	30-7		63% (4,1%)		2,8% (0,4%)		
<b>PR39F56</b> <i>DKC3420</i>	12-7		65% (4,8%)		3,6% (0,8%)		
<b>PR39F56</b> <b>PR39F56</b>	3-4-6-5	104% (6,1%)	62% (3,0%)	45% (2,9%)	2,9% (0,9%)		
<b>Sorten von Pioneer</b>		<b>104% (6,1%)</b>	<b>65% (4,5%)</b>	<b>45% (2,9%)</b>	<b>3,3% (0,8%)</b>	<b>44% (3,7%)</b>	<b>0,0% (0,0%)</b>
<i>Gavott</i> <b>Kuratus</b>	4-16			44% (0,7%)	0,0% (0,0%)		
<b>Kuratus</b> <b>Kuratus</b>	5-6-6-3	101% (9,4%)	65% (3,3%)	46% (3,0%)	3,8% (0,9%)		
<b>Sorten von KWS</b>		<b>101% (9,4%)</b>	<b>65% (3,3%)</b>	<b>46% (3,0%)</b>	<b>3,8% (0,9%)</b>	<b>44% (0,7%)</b>	<b>0,0% (0,0%)</b>
<b>Gesamtmittel</b>		<b>101% (6,2%)</b>	<b>65% (4,2%)</b>	<b>45% (3,0%)</b>	<b>3,3% (0,7%)</b>	<b>43% (4,0%)</b>	<b>0% (0,0%)</b>

Schriftfarbe: **fett** = transgene MON810-Sorte; *kursiv* = konventionelles isogene Sorte

Mit Hilfe der Berechnungsformel aus Abbildung 2 können anhand der gemessenen GVP-Konzentrationen der Einzelkörner die DNA-Mengen in den drei Korngeweben bestimmt werden (siehe Tabelle 3).

Die Maiskolben der von uns verwendeten Sorten waren mit ca. 300-500 Samen besetzt. Da sämtliche Kreuzungsvarianten bei der Aufspaltung eines Hybriden gleich wahrscheinlich sind (1:1:1:1), lässt sich aus den GVP-Prozenten der potentiellen Körner ein Mittelwert errechnen, der dem GVP-Gehalt eines Maiskolbens mit einer geselbsteten hemizygoten (50% gv-) Mutterpflanze bzw. einer konventionellen (0% gv-) Mutterpflanze die mit einem hemizygoten Vater gekreuzt wird, zustrebt. Im ersten Fall sind die Samen eines Kolbens im Mittel 50% transgen und im zweiten Fall zu 18,9% (bei ausreichender Kornzahl).

**Tabelle 3:** Bestimmung des extrahierbaren DNA-Gehaltes der Samengewebe von Mais

F2 GVP Mutter ♀	Embryo		Endosperm		Perikarp		Samen	
<b>50% x</b>	<b>30%</b>	<b>5%</b>	<b>63%</b>	<b>89%</b>	<b>7%</b>	<b>6%</b>	<b>100%</b>	
<b>GVO x GVO</b>		100%		100%		50%	<b>96,5%</b>	<b>97%</b>
<b>GVO x Konv.</b>		50%		66%		50%	<b>60,5%</b>	<b>64%</b>
<b>Konv. x GVO</b>		50%		33%		50%	<b>39,5%</b>	<b>35%</b>
<b>Konv. x Konv.</b>		0%		0%		50%	<b>3,5%</b>	<b>3%</b>
<b>Mittelwert</b>							<b>50%</b>	<b>50%</b>
F2 GVP Mutter ♀	Embryo		Endosperm		Perikarp		Samen	
<b>0% x</b>	<b>30%</b>	<b>5%</b>	<b>63%</b>	<b>89%</b>	<b>7%</b>	<b>6%</b>	<b>100%</b>	
<b>Konv. x GVO</b>		50%		33%		0%	<b>37,8%</b>	<b>35%</b>
<b>Konv. x Konv.</b>		0%		0%		0%	<b>3,5%</b>	<b>3%</b>
<b>Mittelwert</b>							<b>18,9%</b>	<b>18,9%</b>

Schriftfarbe: **fett** = transgene MON810-Sorte; *kursiv* = konventionelles isogene Sorte; schwarz / rechts = Massenanteil des Samengewebes in % (Papazova et al. 2006); grau / links = bestimmter DNA-Gehalt des Samengewebes in %

### Transgenanteile von im Freiland beprobten Silo- und Körnermais

Ziel der Freilandversuche ist, die Effekte praxisrelevanter Erntestrategien auf die GVP-Anteile im Mais zu verifizieren. Je nach Verwendung des Mais existieren in der Landwirtschaft verschiedene Erntemethoden, nach denen die Beprobungsstrategien entworfen wurden. Die Ernte kann im Erntezeitpunkt sowie in den verarbeiteten Maisgeweben variieren. Silomais wird in der Regel als erstes geerntet, gefolgt von Lieschkolben und Körnermais. Für die Rinderfütterung wird Silomais als komplette Pflanze genutzt. Lieschkolben, bevorzugt in der Schweinefütterung eingesetzt, enthalten Kolben mit Spindeln und Lieschblättern. Beim Körnermais werden lediglich

Körner verarbeitet. Je mehr vegetatives Pflanzenmaterial das Erntegut enthält, desto weniger Bedeutung hat die Kreuzung für den Transgenanteil des Produkts.

Die sechswöchige Ernte wurde in ein praxisnahes Zeitfenster von Mitte September bis Ende Oktober gelegt. Es wurden je 80 Pflanzen 'Kuratus' x 'Kuratus' sowie 'Gavott' x 'Kuratus' (Mutter ♀ x Vater ♂) gekreuzt. Die Probenahme erfolgte an sechs Terminen, in einem Zeitraum von Mitte September bis Ende Oktober 2007. Dabei ändert sich der Metabolismus der Kornkompartimente ebenso wie in der gesamten Maispflanze (BBCH 87-90). Pro Termin und Kreuzungsschema wurden zehn Pflanzen beprobt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde auf eine maschinelle Verarbeitung verzichtet. Von den sechs Ernteterminen wurden zunächst drei in möglichst großem zeitlichen Abstand analysiert (Tabelle 4), weitere Termine folgen bei Signifikanz der Unterschiede.

**Tabelle 4:** Erntezeitermine der verarbeiteten Maisproben

<b>Monat</b>	<b>September</b>		<b>Oktober</b>	<b>Summe</b>
<b>Wochen</b>	<b>20.09.2007</b>	<b>09.10.2007</b>	<b>23.10.2007</b>	<b>3</b>
<b>GVO x GVO</b>	8	8	8	<b>24</b>
<b>Referenz GVO</b>	8	8	8	<b>24</b>
<i>Konv.</i> <b>x GVO</b>	8	8	8	<b>24</b>
<b>Referenz <i>Konv.</i></b>	8	8	8	<b>24</b>
<b>Summe</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>96</b>

Schriftfarbe: **fett** = transgene MON810-Sorte; *kursiv* = konventionelles isogene Sorte

Derzeit sind noch nicht alle Proben quantifiziert (Tabelle 5). Die Quantifizierung der Selbstung der hemizygot transgenen MON810-Sorte ‚Kuratus‘ zeigt jedoch die erwarteten GVP-Anteile. Das vegetative Pflanzenmaterial der hemizygoten Mutterlinie muss 50% transgen sein, was sich über alle Ernteterminen bestätigte. Wie schon zuvor bei den Einzelkornuntersuchungen abgeleitet (Tabelle 3) ist bei einer Vermahlung ganzer Körner eines Kolben ebenfalls mit einem GVP-Gehalt von 50%

zur rechnen. Sind sowohl Körner als auch vegetatives Pflanzenmaterial zu 50% transgen, so auch alle anderen Pflanzengewebemischungen wie Lieschen und Mais komplett. Für die Selbstung ‚Kuratus x Kuratus‘ konnte bislang keine Signifikanz der Unterschiede im GVP-Gehalt für die drei Beprobungszeiträume nachgewiesen werden.

Für die Kreuzung der isogenen konventionellen Muttersorte ‚Gavott‘ mit der hemizygoten MON810-Vatersorte ‚Kuratus‘ liegen bislang nur Einzeldaten zu den verschiedenen Ernteterminen vor, die noch nicht gemittelt wurden (Tabelle 6).

**Tabelle 5:** GVP-Anteile der Maisgewebe in der F2 Generation der MON810-Sorte ‚Kuratus‘

Monat	September		Oktober		Summe	
	20.09.2007	09.10.2007	23.10.2007	3		
<b>Kuratus x Kuratus</b>	x s	x s	x s	x	s	
<b>Körner</b>	50% 4,3%	46% 4,2%	47% 4,6%	48%	4,6%	
<b>Lieschen</b>	50% 3,4%	47% 3,3%	50% 3,5%	49%	3,6%	
<b>vegetatives Pflanzenmaterial</b>	51% 3,0%	50% 3,0%	52% 2,1%	51%	2,7%	
<b>Mais komplett</b>	47% 2,6%	48% 15%	52% 8,8%	49%	9,9%	
<b>Referenz Kuratus</b>	?	?	?			
<i>Gavott x Kuratus</i>	?	?	?			
<b>Referenz Gavott</b>	?	?	?			
<b>Summe</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>96</b>		

Schriftfarbe: **fett** = transgene MON810-Sorte; *kursiv* = konventionelles isogene Sorte, Fragezeichen = noch nicht quantifizierte Proben

Die ersten Ergebnisse dieser Kreuzungsvariante zeigen dass, erwartungsgemäß das vegetative Pflanzenmaterial (veg. Planze) der Muttersorte ‚Gavott‘ nicht transgen ist (0%). Das Kornmaterial dagegen nähert sich dem, aus den Einzelkornmessungen

abgeleiteten, Erwartungswert von 18,9% (vergleiche Tabelle 3) an. Unter Berücksichtigung der für die drei Probezeiträume gemittelten Trockengewichte von durchschnittlich 41% für Körner, 65% für Lieschkolben (Kolben inkl. Körner) und 35% für veg. Pflanze erklären sich die Transgenanteile der Lieschkolben und des kompletten Pflanzenmaterials. Für den idealen gv-Gehalt der Körner eines Kolbens mit 18,9% errechnet sich ein gv-Gehalt des Lieschkolbens von ca. 12% (41% x gv-Gehalt Körner plus 24% x 0% veg. Pflanze). Für die Gesamtpflanze lässt sich ein gv-Gehalt von 7,7% errechnen (41% x 18,9% gv-Körner + 0% x 59% veg. Pflanze).

**Tabelle 6:** Erste Quantifizierungsergebnisse der Kreuzung ‚Gavott x Kuratus‘

Monat	September		Oktober		Summe			
	20.09.2007		09.10.2007		23.10.2007		3	
<i>Gavott</i> x <b>Kuratus</b>	x	s	x	s	x	s	x	s
<b>Körner</b>	18%	1,1%	23%	1,1%				
<b>Lieschen</b>	14%	0,7%	23%	2,2%				
<b>vegetatives Pflanzenmaterial</b>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%				
<b>Mais komplett</b>	6,8%	1,9%	9,9%	1,3%				
<b>Körner</b>	3,6%	0,0%						
<b>Lieschen</b>	2,7%	0,0%						
<b>vegetatives Pflanzenmaterial</b>	0,0%	0,0%						
<b>Mais komplett</b>	1,3%	0,3%						
<b>Summe</b>	<b>32</b>		<b>32</b>		<b>32</b>		<b>96</b>	

Schriftfarbe: **fett** = transgene MON810-Sorte; *kursiv* = konventionelles isogene Sorte

Es zeigte sich jedoch, dass die Trockenmasse während der Ernteperiode schwankte, so dass für jeden Erntetermin der wahrscheinliche gv-Gehalt separat errechnet und mit den Analyseergebnissen verglichen werden muss.

Mit Abschluss der Analysen wird somit nicht nur die Frage nach den Einflüssen von Erntezeitpunkte und geernteten Pflanzenmaterial beantwortet werden, sondern auch eine Formel zur Berechnung des Transgenanteils bei bekanntem gv-Kontaminationsgrad der Maiskultur und der wahrscheinlichen Einkreuzungsquelle erstellt werden.

### **Validierung molekularer Nachweissysteme für die GVP-Analyse**

Zur Untersuchung potentieller Effekte nicht exakter GVP-Quantifizierungen, wurden verschiedene Kalibrierstandards verglichen. Nachdem sich bereits mehrere kommerziell erhältliche Plasmidstandards zur Quantifizierung der MON810-Linie als suboptimal heraus stellten (Block und Busch 2007) wurden nun die vom JRC neu auf den Markt gebrachten plasmidalen Standards ERM<sup>®</sup>-AD413 im Vergleich zu genomischen Kalibrierstandards auf ihre Richtigkeit und Robustheit hin untersucht.

Zum Vergleich wurden Kreuzungsproben ‚Kuratus x Kuratus‘ aus dem Gewächshaus parallel mit drei verschiedenen Standards quantifiziert (siehe Tabelle 7). Es wurden zum einen zwei verschiedene Arten von genomischen Kalibrierstandards genutzt und zum anderen die ERM<sup>®</sup>-AD413-Plasmidstandards (JRC 2007).

Der JRC-Standard 1 stellt einen plasmidalen Standard dar, der sowohl die Event Region von MON810 enthält als auch das *hmg*-Maisreferenzgen im Verhältnis 1:1. Zur Herstellung einer Standardreihe wurde er von Stufe zu Stufe mit TE-Puffer verdünnt. Dabei nimmt die absolute DNA-Menge und damit die beiden Zielgene von Stufe zu Stufe ab. Zwei genomische Standards wurden vom LGL aus Pflanzenmaterial der hemizygoten MON810-Sorte ‚Kuratus‘ selbst hergestellt. Zur Erstellung von LGL-Standard 2 wurde genomische MON810-DNA analog zu der Vorgehensweise beim JRC-Standard 1 stufenweise mit TE-Puffer verdünnt (gvDNA + TE). Der LGL-Standard 3 hingegen wurde nicht verdünnt, sondern stufenweise mit Mais-DNA der isogenen konventionellen (konv.) Sorte ‚Gavott‘ vermischt (gvDNA + konv. DNA).

Diese letzte Variante des Standard 3 entspricht am besten der Situation von Praxisproben, bei welchen die Kopienzahl des transgenen Events vor dem Hintergrund hoher genomischer Mais DNA eher gering ist.

**Tabelle 7:** Quantifizierungsergebnisse der F<sub>2</sub>-Generation ‚Kuratus x Kuratus‘ mit verschiedenen Kalibrierstandards

Proben GVO 50%	JRC-Standard 1 ERM <sup>®</sup> -AD413	LGL-Standard 2 gvDNA + TE	Standard 3 gvDNA + konv. DNA
♀ <b>GVO</b> x ♂ <b>GVO</b> 97%	93%	105%	104%
	109%	103%	101%
	93%	93%	111%
	113%	96%	92%
	97%	113%	107%
(s) / x	(9,4%) 101%	(12%) 102%	(11%) 103%
♀ <b>GVO</b> x ♂ <i>Konv.</i> 64%	65%	69%	66%
	64%	71%	73%
	67%	67%	68%
	64%	64%	62%
	69%	65%	64%
	60%	66%	65%
(s) / x	(3,3%) 65%	(2,6%) 67%	(3,6%) 66%
♀ <i>Konv.</i> x ♂ <b>GVO</b> 35%	46%	49%	47%
	46%	49%	42%
	47%	53%	55%
	52%	52%	47%
	43%	47%	46%
	44%	54%	54%
♀ <i>Konv.</i> x ♂ <i>Konv.</i> 3,0%	(3,0%) 46%	(3,7%) 50%	(5,0%) 48%
	3,1%	4,6%	3,4%
	3,6%	4,7%	3,7%
	4,8%	4,9%	4,0%
(s) / x	(0,9%) 3,8%	(0,2%) 4,7%	(0,3%) 3,7%

Schriftfarbe: **fett** = transgene MON810-Sorte; *kursiv* = konventionelles isogene Sorte; schwarzes ‚x‘ = Mittelwert, graue Zahlen = Standardabweichung

Ein Auszug der Ergebnisse zeigt Tabelle 7. Da die F<sub>2</sub>-Generation durch Selbstung der hybriden F<sub>1</sub>-Generation entstanden ist, spalten die vier möglichen Samentypen zufällig aber statistisch gesehen in gleichem Verhältnis auf. Bei der geringen Kornzahl von zwanzig kommen die vier potentiellen Genotypen nicht gleich häufig vor. Sowohl die Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der gv-Anteile, als auch die Standardabweichungen ( $s'$ ) zeigen keine großen Unterschiede zwischen den Kalibrierstandards. Alle Standards haben den erwarteten gv-Gehalt leicht (5-10%) überschätzt. In der Real Time PCR gelten Schwankungen im Bereich von 20% als normal. Wobei LGL-Standard 2 (gvDNA + TE) die größten Schwankungen zeigt. LGL-Standard 3 (gvDNA + konv. DNA) und der JRC-Standard ERM<sup>®</sup>-AD413 sind daher am besten geeignet.

Vergleicht man den genomischen LGL-Standard 3 mit dem plasmidalen JRC-Standard 1 so haben beide Vor- und Nachteile. Der genomische LGL-Standard 3 ist auch bei Kühlschranklagerung (4°C) über mehrere Wochen stabil ohne, dass die Standardabweichung der niedrigen Verdünnungsstufen stark steigen. Dies bedeutet eine höhere Robustheit und längere Empfindlichkeit der Standards. Andererseits können genomische Standards nur selbst hergestellt werden, wenn Referenzsamen der entsprechenden GVP-Linie vorhanden ist.

Ein deutlicher Vorteil der neuen ERM<sup>®</sup>-AD413 Plasmide ist der kommerzielle Erwerb, der eine Anzucht von Pflanzenmaterial überflüssig macht. Es zeigte sich jedoch, dass der JRC-Standard 1 bei einer Lagerung im Kühlschrank über mehr als eine Woche degeneriert. Es kommt insbesondere zu Degenerationen im niedrigen Kopienbereich und zur Erhöhung der Standardabweichung. Diese Schwankungen resultieren in einer zunehmend eingeschränkten Sensitivität des Assays. Sind die ERM<sup>®</sup>-AD413 Standards so aliquotiert, dass aufgetaute Aliquots innerhalb von einer Woche aufgebraucht werden können (4°C Lagerung) erzielen sie sehr gut Quantifizierungsergebnisse.

## Referenzen

A. Block und U. Busch. Sicherheitsforschung bei gentechnisch veränderten Pflanzen. in Fachtagung Gentechnik in Oberschleißheim am 25. Oktober 2007

Gruber H., Eder J., M. Müller und H. Spiekers, 3. Fachtagung Gentechnik in

Oberschleißheim am 02. Dezember 2009

Hernández, M, M-N Duplan, G Berthier, N Vaïtilingom, W Hauser, R Freyer, M Pla, and Y Bertheau. 2004. Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of zeamays L. *Agriculture and food chemistry* 52:4632-4637.

Holck, A, M Vaitilingon, L Didierjean, and K Rudi. 2002. 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard maize. *Eur Food Res Technol* 214:449-453.

Holst-Jensen, Arne, Marc de Loose, and Guy van den Eede. 2006. Coherence between legal requirements and approaches for detection of genetically modified organisms (GMOs) and their derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:2799-2809.

[http://irmm.jrc.ec.europa.eu/html/reference\\_materials\\_catalogue/user\\_support/erm\\_application\\_notes/application\\_note\\_5/application\\_note\\_5\\_english.pdf](http://irmm.jrc.ec.europa.eu/html/reference_materials_catalogue/user_support/erm_application_notes/application_note_5/application_note_5_english.pdf)

Kruse, M. 2002. GVO-Verunreinigungen in konventionellem Saatgut: Schwellenwerte, Nachweisverfahren, Ergebnisse. *Forschungsschwerpunkt Biotechnologie und Pflanzenzüchtung* 8.Kolloquium.

Papazova, N, A Malef, A Degrieck, IE Van Bockstaile, and M De Loose. 2005. DNA extractability from the maize embryo and endosperm - relevance to GMO assessment in seed samples. *Seed Science and Technology*:533-542.

# Nachweisstrategien für die Detektion nicht zugelassener GVO

Esther Meißner, Patrick Gürtler, Ulrich Busch

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,

85764 Oberschleißheim

## Zusammenfassung

Das Ziel des vom StMUG geförderten Forschungsprojektes ist die Erfassung aller gentechnisch veränderten Organismen (GVO) weltweit. Dazu wurden in Form einer Tabelle alle wichtigen Daten (z.B. Genelemente, Anbaugebiet, Zulassungsstatus EU, vorhandene Nachweismethoden, etc.) zusammengetragen. Zum jetzigen Zeitpunkt beinhaltet die Tabelle 259 verschiedene gentechnisch veränderte (gv-) Pflanzenlinien, die sich aus 30 verschiedenen Pflanzenarten zusammen setzen.

## Einleitung

Um gentechnisch veränderte Bestandteile in Lebens- und Futtermitteln erkennen zu können, werden detaillierte Kenntnisse über die gentechnisch veränderten Organismen benötigt. Die Entwickler von gentechnisch veränderten Organismen müssen im Rahmen des Zulassungsprozesses in der EU sowohl Daten über die molekulare Charakterisierung der Organismen als auch entsprechende Methoden für ihre eindeutige Identifizierung bereitstellen. Zum Stand 20. Oktober 2009 waren 30 gv-Pflanzenlinien (Events) als Lebens- oder Futtermittel zugelassen, für weitere 39 gv-Pflanzenlinien war die Zulassung beantragt. Für all diese gv-Pflanzenlinien sind validierte Eventspezifische Nachweismethoden auf der Internetseite der Europäischen Union – Community Reference Laboratory (EU-CRL) abrufbar [1].

Für nicht zugelassene GVO gilt in der EU eine "Null-Toleranz" [2, 3]: Sie dürfen grundsätzlich nicht in den Handel gelangen. Jeder Nachweis einer in der EU nicht zugelassenen gv-Pflanzenlinie hat zur Folge, dass die daraus hergestellten Produkte

nicht in Verkehr gebracht werden dürfen. Dabei spielt es keine Rolle, wie hoch der GVO-Anteil ist. Für in Europa nicht zugelassene GVO liegen keine Nachweisverfahren und Referenzmaterialien vor. Das Fehlen von Informationen über die eingefügten genetischen Elemente in diesen Organismen macht ihren Nachweis außerordentlich schwierig. Im Rahmen des vorbeugenden Verbraucherschutzes werden innerhalb einer Importanalyse weltweit vorhandene GVO katalogisiert und die Möglichkeit eines Screeningnachweises innerhalb der EU geprüft.

### **Weltweiter Anbau von gentechnisch veränderten Nutzpflanzen**

Die Anzahl der Länder, die gv-Pflanzen anbauen ist in den letzten Jahren stetig gestiegen. Waren es 1996, dem ersten Jahr der kommerziellen Nutzung von gv-Pflanzen, noch 6 Länder, so sind es 2008 schon 24 Länder [4], in Deutschland ist der Anbau von gv-Maislinie MON810 seit April 2009 verboten [5]: 1. USA, 2. Kanada, 3. Mexiko, 4. Kolumbien, 5. Chile, 6. Paraguay, 7. Uruguay, 8. Honduras, 9. Argentinien, 10. Brasilien, 11. Bolivien, 12. China, 13. Indien, 14. Philippinen, 15. Australien, 16. Südafrika, 17. Burkina Faso, 18. Ägypten, 19. Tschechien (EU), 20. Slowenien (EU), 21. Portugal (EU), 22. Spanien (EU), 23. Polen (EU), 24. Rumänien (EU).

Öffentlichen Datenbanken zufolge haben 127 verschiedene gv-Nutzpflanzen-Events insgesamt weltweit eine Anbaugenehmigung. Das entspricht in etwa der Hälfte der 259 recherchierten Events (siehe Tabellen 1-3) [4, 6-16]. Bei 22 von 31 Nutzpflanzenarten ist zumindest zum Teil bekannt, in welchem Land sie angebaut werden, bzw. eine Anbau-Zulassung haben (Tabelle 1 und 2). Bei 9 gv-Nutzpflanzenarten ist nicht bekannt ob oder wo sie angebaut werden (Tabelle 3). Die weitaus größte Anzahl an zugelassenen (deregulierten) gv-Pflanzenlinien werden in den USA angebaut [6]. In den USA ist auch die Artenvielfalt an angebauten gv-Pflanzen am größten: Die USA baut 12 verschiedene Pflanzenarten mit 80 verschiedenen gv-Pflanzenlinien an [10], Kanada 6 Arten (51 gv-Pflanzenlinien) [11], in China werden möglicherweise 7 Arten (10 gv-Pflanzenlinien) angebaut [4, 13], es konnten aber keine offiziellen Angaben für China gefunden werden.

**Tabelle 1:** Anbau-Zulassung in mehr als einem Land

gv-Nutzpflanzenart	Anzahl Linien/Events	Anbauländer
Baumwolle	30	USA; Mexiko; Kolumbien; Argentinien; Brasilien; China; Indien; Australien; Südafrika; Burkina Faso
Kartoffel	20	USA; Kanada
Mais	60	USA; Kanada; Mexiko; Chile; Uruguay; Honduras; Argentinien; Brasilien; Philippinen; Südafrika; Ägypten, EU (Tschechien, Slowenien, Portugal, Spanien, Polen, Rumänien)
Nelke	22	Kolumbien; Australien
Papaya	2	USA; China
Raps	25	USA; Kanada; Chile; Australien
Reis	29	USA; China
Soja	18	USA; Kanada; Mexiko; Chile; Paraguay; Uruguay; Argentinien; Brasilien; Bolivien; Südafrika
Tomate	16	USA; Mexiko; China
Rübe/Zuckerrübe	7	USA; Kanada

**Tabelle 2:** Anbau-Zulassung in nur einem Land

gv-Nutzpflanzenart	Anzahl Linien/Events	Anbauländer
Adzuki Bohne	1	Indien
Flachs	1	USA
Kürbis	2	USA
Luzerne	1	Kanada
Pappel	3	China
Petunie	2	China
Radicchio	1	USA
Paprika	1	China
Tabak	1	USA

**Tabelle 3:** Entwickelte Pflanzen, Anbau-Zulassung in keinem Land bekannt

gv-Nutzpflanzenart	Anzahl Linien/Events	Anbauländer
Aubergine	1	nicht bekannt
Blumenkohl	1	nicht bekannt
Broccoli	1	nicht bekannt
Creeping Bentgrass	1	nicht bekannt
Crysantheme	1	nicht bekannt
Eukalyptus	1	nicht bekannt
Gurke	1	nicht bekannt
Melone	2	nicht bekannt
Pflaume	1	nicht bekannt
Rose	2	nicht bekannt
Torenia	1	nicht bekannt
Weizen	2	nicht bekannt

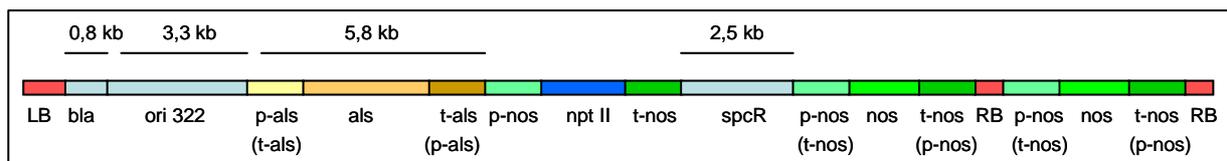
10 gv-Pflanzenarten werden häufig in mehreren gv-Pflanzenlinien und in vielen verschiedenen Ländern angebaut (Tabelle 1). 9 Arten werden nur in einem Land angebaut (Tabelle 2), für 12 Arten ist der Anbau derzeit in keinem Land bekannt (Tabelle 3). In einem Land zum Anbau zugelassene oder deregulierte gv-Pflanzenlinien müssen nicht zwangsläufig auch angebaut werden.

### **Welche Genelemente gibt es und in welchen gv-Pflanzen sind sie zu finden?**

Der klassische Aufbau einer Genkassette besteht aus:

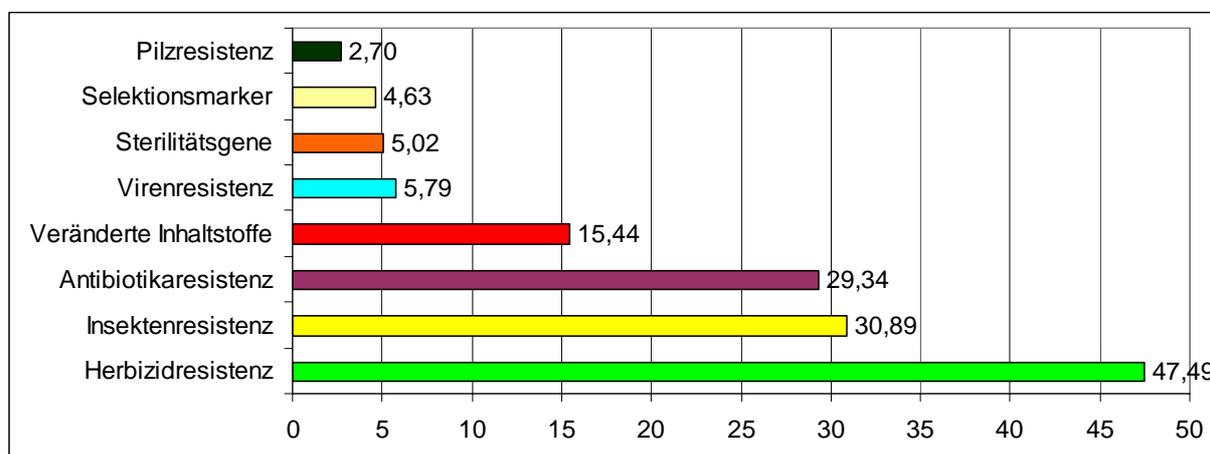
*Promoter-(Transitpeptid)-Genelement-Terminator*

Abbildung 1 zeigt beispielhaft den komplexeren Aufbau eines Genkonstruktes (Genkonstrukt aus gv-Pflanzenlinie FP967, verändert nach einer Abbildung aus dem BATS-Report [17]), dass z.B. mit Hilfe von Agrobakterien in das pflanzliche Genom eingebracht wird. Hier sind drei Kassetten (Kassette 1: Herbizidresistenz ALS; Kassette 2: Kanamycinresistenz nptII; Kassette 3 Nopalinsynthase nos) und zusätzliche Sequenzabschnitte zu sehen. Mitunter ist so ein komplexes Genkonstrukt in mehreren Kopien im pflanzlichen Genom integriert und die Orientierung der einzelnen Gensequenzen ungeklärt.



**Abbildung 1:** Genkonstrukt aus der gentechnisch veränderten Flachlinie FP967 (verändert nach BATS-Report [17])

Aktuell konnten 55 verschiedene Promoterelemente, 27 Terminatorelemente, 11 Signalpeptide, 5 Antibiotikaresistenzverleihende Elemente, 15 Elemente zur Herbizidresistenz, 21 Insektenresistenz Elemente, 7 Virusresistenz Elemente, 3 Pilzresistenz Elemente, 16 Elemente zur Veränderung der pflanzlichen Inhaltsstoffe, 4 Selektionsmarker und 3 Sterilitätsgene festgestellt werden, die in den verschiedenen gv-Pflanzenlinien Verwendung finden [2, 6-10]. Zurzeit sind 123 gv-Pflanzenlinien mit transgen vermittelter Herbizidresistenz gegen 6 Herbizide auf dem Weltmarkt, dies entspricht ca. der Hälfte (47,5 %) der gv-Pflanzen mit bekannten und unbekannt neuen Merkmalen (bei 259 gv-Pflanzenlinien insgesamt), siehe Abbildung 2. Insektenresistenz und Antibiotikaresistenz sind in ca. 30 % aller gv-Pflanzenlinien vertreten, Virenresistenz, Sterilitätsgene, Selektionsmarker zu ca. 5 %. Genelemente zur Pilzresistenz sind bisher nur in 7 gv-Pflanzenlinien (2,7 %) eingebracht worden.



**Abbildung 2:** Häufigkeit einzelner Genelemente in gv-Pflanzenlinien in % von 259 gv-Pflanzenlinien insgesamt.

## Screeningstrategien, Nachweismethoden, Referenzmaterial

Die durch die Recherche zusammengetragenen weltweit existierenden 259 verschiedenen gv-Pflanzenlinien können durch Import von Lebens- und Futtermitteln auch in die EU gelangen. Lebens- und Futtermittel werden bei der Einfuhr, aber auch an späteren Punkten der Handelskette, auf Beimengungen von nicht zugelassenen gv-Bestandteilen hin überprüft. Hierzu können verschiedene Screeningmöglichkeiten dienen. Durch die Kenntnis der eingeführten Genelemente in die einzelnen gv-Pflanzenlinien kann theoretisch auf die Erfassung bei einem Screening nach bestimmten Genelementen geschlossen werden. Im Folgenden bezieht sich diese theoretische Screening-Erfassung auf die recherchierten 259 gv-Pflanzenlinien insgesamt:

- Es werden 107 Pflanzenlinien erfasst, wenn nach den Herbizidresistenz-verleihenden Elementen **bar/pat/CP4epsps/ZMepsps** gescreent wird. Bei 80 Pflanzenlinien ist nicht bekannt, ob sie eines dieser Elemente enthalten, 72 Pflanzenlinien enthalten keines dieser Genelemente.
- Beim Screening nach **ubiZM-Promoter und cry1Ab** Insektenresistenz werden fast ausschließlich Maislinien erfasst (insgesamt 44 Events, davon neben Mais 5 Baumwolle, 2 Reis, 1 Weizen). Bei 100 Pflanzenlinien ist nicht bekannt, ob eines der beiden Elemente vorkommt, bei 115 Pflanzenlinien sind diese Elemente nicht vorhanden. Das Screening nach ubiZM und cry1Ab eignet sich vor allem für Mais. Allerdings werden alle durch ubiZM/cry1Ab erfassten Pflanzenlinien, bis auf drei Baumwoll-Linien (b5, b6, b7), ebenfalls durch das Screening nach CaMV35S/t-nos erkannt.
- Am häufigsten (146 mal) treten die Elemente **CaMV35S-Promoter und nos-Terminator** auf. Bei 102 Pflanzenlinien ist das Vorhandensein unbekannt. Nur in 11 Pflanzenlinien mit bekannten Genelementen sind diese Elemente nicht zu finden (siehe Einfuhranalyse). Somit eignet sich das Screening nach CaMV35S/t-nos am besten für ein erstes Screening.

Auf der offiziellen Internetseite der Europäischen Union - Community Reference Laboratory (EU-CRL)[1] werden alle innerhalb der EU durch Ringversuche validierten Methoden zur Detektion von GVOs veröffentlicht. Von den 259 weltweit

recherchierten gv-Pflanzenlinien gibt es für 56 gv-Pflanzenlinien validierte Methoden zur Eventspezifischen Detektion (Stand 20. Oktober 2009). Für 24 Events sind Methoden im Stadium der Entwicklung. Insgesamt sind also bald ca. 30 % der weltweit recherchierten gv-Pflanzenlinien durch validierte Detektionsmethoden abgedeckt. Dabei muss beachtet werden, dass 1. nicht alle 259 angegebenen Pflanzen wirklich angebaut und gehandelt werden, 2. die Liste des EU-CRL ständig aktualisiert und erweitert wird, und 3. im Augenblick eine Vielzahl an neuen gv-Pflanzenlinien weltweit entwickelt werden. Vom EU Community Reference Laboratory werden hauptsächlich Methoden für gv-Pflanzen entwickelt, die in der EU zugelassen sind oder für die eine Zulassung beantragt ist.

In Deutschland werden vorwiegend durch die Lebensmittelüberwachung der Länder Proben von Lebens- und Futtermitteln untersucht. Dabei wird bei einem ersten Screening zum Beispiel auf das Vorhandensein von CaMV35S- Promoter und NOS-Terminator hin gescreent. Dies führt zu einer Detektion von 146 aus 259 gv-Pflanzen. Das entspricht 56% von 259. Durch das Screening auf CaMV35S-Promoter/NOS-Terminator werden nur 11 gv-Pflanzen mit bekannten Genelementen nicht erfasst. Diese sind:

1. Baumwolle GHB614
2. Baumwolle 3006-210-23
3. Baumwolle 281-24-236
4. Baumwolle 3006-210-23x281-24-236
5. Luzerne J101xJ163
- 6. Mais LY038**
- 7. Soja 305423**
- 8. Soja 356043**
9. Soja MON89788
10. Soja MON89788xMON87701
11. Zuckerrübe H7-1

Die fett gedruckten gv-Pflanzenlinien (1 Maislinie, 2 Sojalinien) enthalten, im Gegensatz zu den anderen 8 aufgelisteten gv-Pflanzenlinien, keines der Genelemente pat, Cp4epsps oder Zmepsps (siehe Tabelle 4). Für alle drei fett gedruckten gv-Pflanzenlinien wurde bei der EU ein Antrag auf Zulassung als Lebens- und Futtermittel gestellt. Deswegen sind für diese Eventspezifische Nachweisverfahren unter EU-CRL vorhanden [1].

Es sollte bei der Untersuchung von Lebens- und Futtermitteln darauf geachtet werden, dass auch die zuvor genannten gv-Pflanzenlinien durch ein geeignetes Screeningverfahren erfasst werden. Das Mais-Event (m37) kann z.B. durch Nachweis eines Actin1-Introns aus Reis detektiert werden. Soja-Event (s8) kann durch Nachweis der Herbizidresistenz gat4601 oder des Terminators pinII aufgespürt werden. Für ein Screening ist es kompliziert bis unmöglich gv-Pflanzen nachzuweisen, die ausschließlich endogene Gene, bzw. modifizierte endogene Gene, für die Transformation benutzen, wie z.B. in Soja-Event (s7) 305423. Für Soja-Event (s7) könnte der Nachweis durch einen Konstrukt-spezifischen Nachweis z.B. von SAMS-Promoter zum gm-hra-Gen gelingen, bzw. einem Screening nach der Punktmutation im gm-hra Genelement. Sehr schwierig gestaltet sich der Nachweis der 88 gv-Pflanzenlinien mit den völlig oder teilweise unbekanntem Genelementen. Hier ist eine Aufklärung dringend nötig, insbesondere in Hinblick auf die aktuelle Anbausituation.

**Tabelle 4:** gv-Pflanzenlinien mit bekannten Genelementen, ohne 35S/t-nos, ohne pat, bar, epsps

Unique Identifier	Event	Trait	Promoter	Terminator	Veränderte Inhaltstoffe	Antibiotika-resistenz	Herbizid-resistenz	Insekten-resistenz
REN-00038-3	LY038	Erhöhter Lysingehalt	p-Glb1 (Z.m.), ract1 intron	3' Glb1 (Z.m.)	cordapA	cordapA		
DP-305423-1	305423	Erhöhter Ölsäuregehalt Sulfonylurea-Resistenz	Kti3 SAMS	3' Kti3 3' gm-als	gm-fad2-1		gm-hra	
DP-356043-5	356043	Glyphosatresistenz Sulfonylurea-Resistenz	SCP1/TMV omega 5'-UTR SAMS	3' pin II 3' gm-als			gat4601 gm-hra	

### Anbau und Handel, Importrisiko für nicht zugelassene gv-Pflanzen

Beispielhaft wurde die Handelssituation von Soja näher untersucht: gv-Soja wird weltweit auf 65,8 Mio. Hektar angebaut. Damit entfallen 53% der weltweiten Anbaufläche (125 Mio. Hektar) für gv-Nutzpflanzen auf Soja [4]. Die Europäische Union importiert jährlich ca. 35-40 Mio. Tonnen Sojabohnen und Sojarohstoffe und zwar fast zu 100% aus Brasilien, den USA, Argentinien und Paraguay. Brasilien, USA, Argentinien und Paraguay exportieren zusammen ca. 71,3 Mio. Tonnen der insgesamt 74,8 Mio. Tonnen exportierten Sojabohnen weltweit [18]. Der Anteil an gv-Soja beträgt in Brasilien ca. 64%, in den USA ca. 92%, in Argentinien ca. 98% und in Paraguay ca. 93% [2]. Durch den hohen Import von Soja in die EU lässt sich eine Einfuhr von gv-Soja quasi nicht verhindern.

Brasilien produzierte 2007/2007 61,0 Mio. t Sojabohnen, davon 9,14 Mio. t (=36%) konventionell [2, 18]. Die EU führte aber 2007/2008 ca. 18,6 Mio. t Sojabohnen und Sojaerzeugnisse aus Brasilien ein [18], das bedeutet, dass ca. die Hälfte des Imports aus gv-Soja bestand. Vorwiegend im Norden des Landes werden in Brasilien noch fast 9 Mio. Tonnen Soja konventionell angebaut, da im heißeren Klima im Norden Brasiliens die an ein gemäßigteres Klima angepassten gv-Sojabohnen schlechter wachsen. Die europäische Lebensmittelwirtschaft, die eine Gentechnik-Kennzeichnung ihrer Produkte vermeiden will, bezieht "gentechnik-freie" Sojarohstoffe in der Regel aus Brasilien [2]. Für die Trennung auf allen Stufen vom Anbau über den Transport bis hin zur Verarbeitung wird dort ein großer Aufwand betrieben. Trotzdem lässt sich eine Vermischung nicht zu 100% vermeiden. In der EU sind Lebens- und Futtermittel von der Kennzeichnung nur dann ausgenommen, wenn der GVO-Anteil unter 0,9 % nachweislich zufällig und technisch unvermeidbar ist. Für nicht zugelassene GVO gilt 0 %.

**Tabelle 5:** Soja-Handel

	EU-Einfuhr (Mio. t)	aus Brasilien (Mio. t)
Sojabohnen	15,2	9,5
Sojaöl	1,0	0,7
Sojaschrot	23,5	8,5

## Schwierigkeiten

- In vielen Ländern existieren keine offiziellen Homepages für gv-Pflanzenanbau, z.B. zugelassene Maissorten in Chile? Welche gv-Pflanzenlinien werden aktuell angebaut in Amerika, Indien, China?
- Fremdsprachige Internetseiten erschweren die Recherche (portugiesisch, spanisch, chinesisches, ...)
- Pflanzen mit seltenen Genelementen werden beim Screening nicht entdeckt
- Es werden vermehrt Pflanzen mit endogenen Genelementen entwickelt
- Für den Nachweis eines spezifischen Events muss Referenzmaterial vorhanden sein

## Referenzen

[1] <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/>

[2] [www.transgen.de](http://www.transgen.de)

[3] [http://ec.europa.eu/food/dyna/gm\\_register/index\\_en.cfm](http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm)

[4] Clive, James (2008). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2008. ISAAA, International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. Brief No. 39 – [www.isaaa.org](http://www.isaaa.org)

[5] Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz; Pressemitteilung 063 14.04.09 11:20

[6] [www.agbios.com](http://www.agbios.com)

[7] <http://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/>

[8] <http://www2.oecd.org/biotech/byIdentifier.aspx>

[9] <http://bch.cbd.int/>

[10] [http://usbiotechreg.nbio.gov/database\\_pub.asp](http://usbiotechreg.nbio.gov/database_pub.asp)

[11] [http://active.inspection.gc.ca/scripts/database/pntvcn\\_tabdb.asp?lang=e&crops=all&company=all&trait=all&events=all](http://active.inspection.gc.ca/scripts/database/pntvcn_tabdb.asp?lang=e&crops=all&company=all&trait=all&events=all)

- [12] [http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/00/programas/conabia/bioseguridad\\_agropecuaria2.php#eventos](http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/00/programas/conabia/bioseguridad_agropecuaria2.php#eventos)
- [13] <http://datacenter.biosafety.gov.cn/authoritye.do?method=list>
- [14] [http://www.egypt-bic.com/biotec\\_egypt.htm](http://www.egypt-bic.com/biotec_egypt.htm)
- [15] <http://www.s.affrc.go.jp/docs/sentan/eguide/edevelop.htm>
- [16] <http://www.bch.biodic.go.jp/english/lmo.html>
- [17] BATS, 30/06/2003 "Genetically Modified (GM) Crops: molecular and regulatory details", Version 2, Dr. Shirin Bruderer, Katharina E. Leitner, Jacob Lindenmeyer;  
<http://www.bats.ch>
- [18] [http://www.acti.de/media/Statistikbroschuere\\_Maerz\\_2009.pdf](http://www.acti.de/media/Statistikbroschuere_Maerz_2009.pdf)

# Ein parallelisiertes Analyseformat zur Diagnostik von GVO mittels Real-Time PCR

Lars Gerdes und Sven Pecoraro

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,

85764 Oberschleißheim

Seit Beendigung des *de facto* Moratoriums 2004 über die Zulassung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) sind bei der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) mittlerweile über 60 Anträge auf Zulassung von gentechnisch veränderten Pflanzen (GVP) als Lebens- und Futtermittel eingegangen (Abb. 1, [1]). Für die amtliche Lebens- und Futtermittelüberwachung bedeutet die damit stark gestiegene Anzahl an potentiellen GVO in einem Produkt einen erheblichen Analyseaufwand [2]. Die standardmäßige sequentielle Analyse aller in Frage kommenden GVO ist zunehmend zeit- und kostenintensiv. In absehbarer Zeit wird die sequentielle Untersuchung von komplexen Lebens- und Futtermittelproben daher an Kapazitätsgrenzen stoßen. Als Konsequenz wurde im vorgestellten, vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit geförderten Forschungsprojekt ein parallelisiertes Real-Time PCR Analyseformat entwickelt, mit dem die zeit- und kostenintensive sequentielle Untersuchung von Lebens- und Futtermittelproben auf GVO-Bestandteile ersetzt werden kann. Dieses parallelisierte Analyseformat ermöglicht eine rationelle Diagnostik auch der zahlreichen neu zugelassenen GVO und kann bei Bedarf um weitere Einzelnachweise flexibel erweitert werden. Die für die qualitative Analytik einer Probe notwendigen Nachweisreaktionen werden zusammen in einem Mikrotiterplatten-Format untergebracht, so dass die relevanten Reaktionen dann gleichzeitig, d.h. parallel, in einem Lauf des Real-Time PCR-Gerätes erfolgen. Pro Lauf müssen nicht nur die eigentlichen Proben analysiert werden, sondern mindestens auch eine positive sowie eine negative Kontrolle pro Nachweissystem. Die Anordnung der Nachweisreaktionen in der Mikrotiterplatte soll die Handhabung des Systems durch die Mitarbeiter im Labor unterstützen und damit Pipettierfehlern vorbeugen.

## Baumwolle

1. LLCotton25
2. MON 1445
3. MON 15985
4. MON 15985 x MON 1445
5. MON 531
6. MON 531 x MON 1445
7. 281-24-236 x 3006-210-23
8. GHB814
9. LLCotton25 x MON16986
10. MON 88913
11. MON 88913 x MON 15985
12. 281-24-236 x 3006-210-23 x MON 88913



## Zuckerrübe

1. H7-1
2. A5-15



## Nelke

1. Moondust
2. Moonlite
3. Moonshadow
4. Moonaqua



## Reis

1. LL62



## Raps

1. Ms8 x Rf3
2. RT73
3. T45
4. GS 40/90
5. L62
6. Ms8 x Rf3 x RT73



## Soja

1. 40-3-2
2. A2704-12
3. MON 89788
4. 305423
5. 305423 x 40-3-2
6. 356043
7. A5547-127
8. MON 87701 x MON 89788
9. BPS-CV127-9
10. MON 87769



## Kartoffel

1. EH92-527-1
2. AV43-6-37



## Arabidopsis

1. B12



## Mais

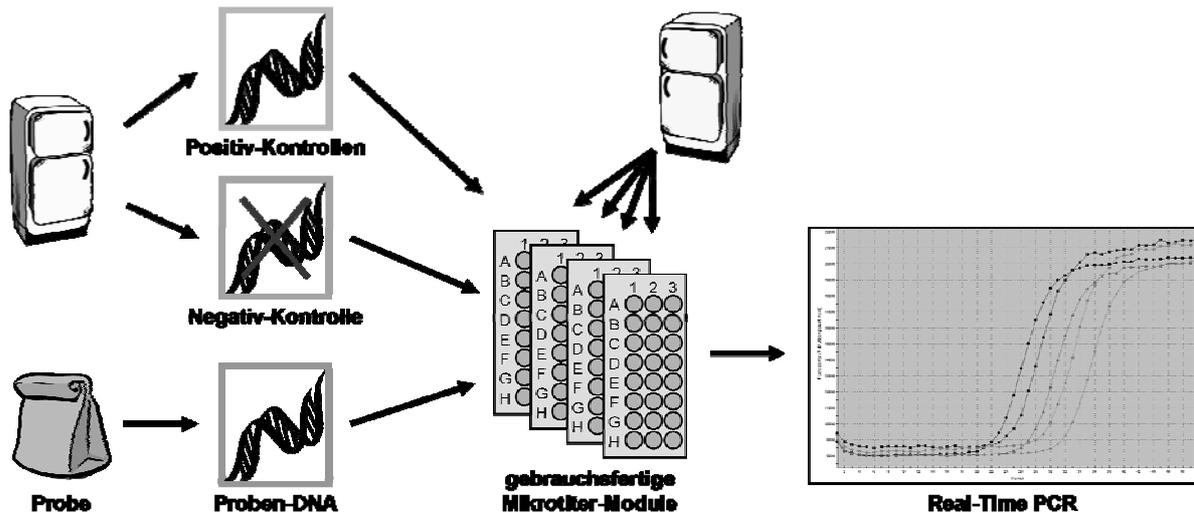
1. 59122
2. Bt11
3. GA21
4. MON 810
5. MON 863
6. MON 863 x MON 810
7. MON 863 x NK603
8. NK603
9. NK603 x MON 810
10. T25
11. TC1507
12. TC1507 x NK603
13. 3272
14. 59122 x NK603
15. 59122 x TC1507 x NK603
16. 98140
17. Bt11 x GA21
18. Bt11 x MIR604
19. Bt11 x MIR604 x GA21
20. LY038
21. LY038 x MON 810
22. MIR604
23. MIR604 x GA21
24. MON 863 x MON 810 x NK603
25. MON 88017
26. MON 88017 x MON 810
27. MON 89034
28. MON 89034 x TC1507 x MON 88017 x 59122
29. MON 89034 x MON 88017
30. MON 89034 x NK603
31. TC1507 x 59122
32. MON 89034 x TC1507 x NK603
33. Bt11 x MIR162 x GA21
34. Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21
35. MON 87480



**Abbildung 1:** In der EU zugelassene und zur Zulassung beantragte GVP. Die Abbildung listet die derzeit in der EU zugelassenen GVP sowie diejenigen, für die ein Zulassungsantrag bei der EFSA eingereicht wurde (Quelle: Transgen und EFSA, Stand: 11.11.2009).

Die entwickelten Modulsysteme für Mais, Soja, Reis und Raps basieren auf validierten Einzelnachweisen (z.B. vom Gemeinschafts-Referenzlabor der EU (CRL, [3])), werden mit Hilfe eines Pipettierroboters auf Vorrat hergestellt und dann bei -20 °C platzsparend gelagert. Bei Verwendung werden jeweils 5 µl DNA-Lösung pro Nachweis hinzugefügt und die Real-Time PCR kann gestartet werden (Abb. 2).

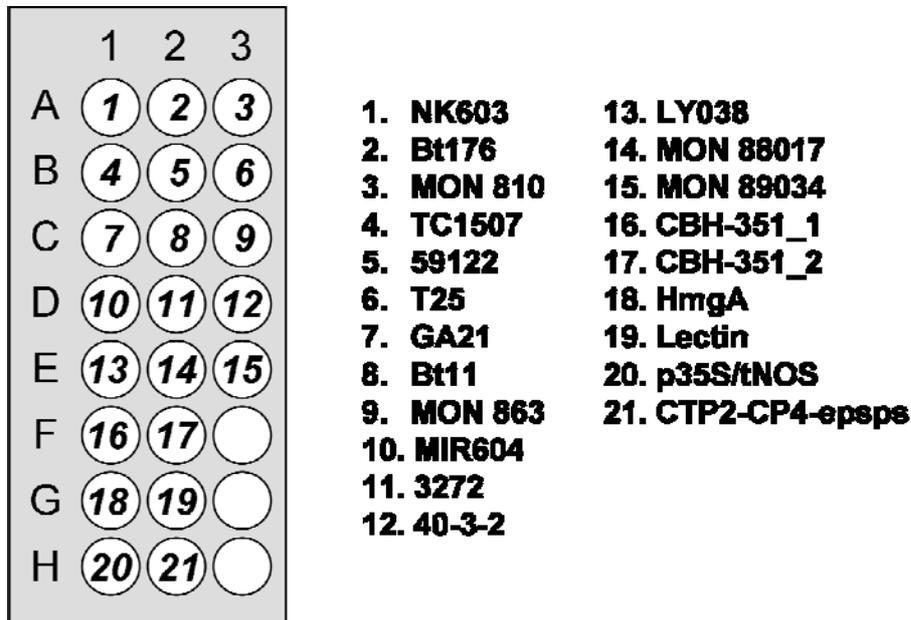
Am Beispiel von Mais soll das entwickelte Modulsystem vorgestellt werden. Mais stellt für die GVO-Analytik eine sehr große Herausforderung dar. Es gibt bereits über zehn in der EU zugelassene gentechnisch veränderte Maislinien, über 30 stehen im Zulassungsprozess (Abb. 1, [1, 4]). Diese enorme Anzahl beruht einerseits auf vielen einzelnen Linien, andererseits aber nicht unwesentlich auf zahlreichen Kreuzungen (sogenannten „Stacks“) zwischen diesen einzelnen Linien. In diesen über zwanzig Stacks sind zwei, drei oder sogar vier Maislinien zu einer neuen Maislinie kombiniert.



**Abbildung 2:** Ablauf des modularen Ansatzes. Gebrauchsfertige Mikrotiter-Module werden mit genomischer DNA isoliert aus der Probe, DNA-Mischungen als Positiv-Kontrollen und Pufferlösung als Negativ-Kontrolle beladen. Direkt im Anschluss werden die Module zusammen mittels qualitativer Real-Time PCR analysiert.

Es gibt keine speziellen molekularbiologischen Nachweise für Stacks, sie werden durch den Nachweis der einzelnen beteiligten Maislinien detektiert. Insgesamt sind für die Routineanalytik momentan 15 Maislinien (ohne Stacks) relevant, so dass die Nachweissysteme für diese 15 relevanten Linien in einem Maismodul vereinigt wurden (Abb. 3). Zusätzlich wurden die Nachweise für die Referenzgene HmgA (Mais) sowie Lectin (Soja) integriert. HmgA ermöglicht eine Aussage über die DNA-Qualität der Probe, ohne HmgA-Nachweis ist auch keine Aussage über negative Reaktionen auf GVO-Mais zulässig. Da RoundupReady-Soja (40-3-2) in vielen Lebens- und Futtermitteln in Spuren nachweisbar ist [2], wurden der Lectin- und der 40-3-2-Nachweis mit aufgenommen. Die Nachweise für die häufig verwendeten genetischen Elemente p35S, tNOS und CTP2-CP4-epsps vervollständigen das Maismodul. Von den 24-Wellen einer Mikrotiterplatte sind 21 mit Nachweisreaktionen belegt, drei sind noch frei und können bei Bedarf belegt werden. Beim p35S/tNOS-Nachweis handelt es sich um eine Duplexreaktion, d.h. zwei Nachweise finden zusammen in einem Well statt CBH-351 (StarLink) wird in zwei Reaktionen nachgewiesen, da diese Nachweise auf SybrGreen-Systemen beruhen, die nicht so spezifisch sind wie die sonst verwendeten Systeme mit TaqMan-Sonden. Durch die Verwendung von zwei unabhängigen Nachweisen lässt sich die Spezifität des StarLink-Tests besser absichern.

Vier 24er-Module können nebeneinander eingesetzt werden, so dass gleichzeitig eine Positiv-, eine Negativ-Kontrolle und zwei Proben analysiert werden können.

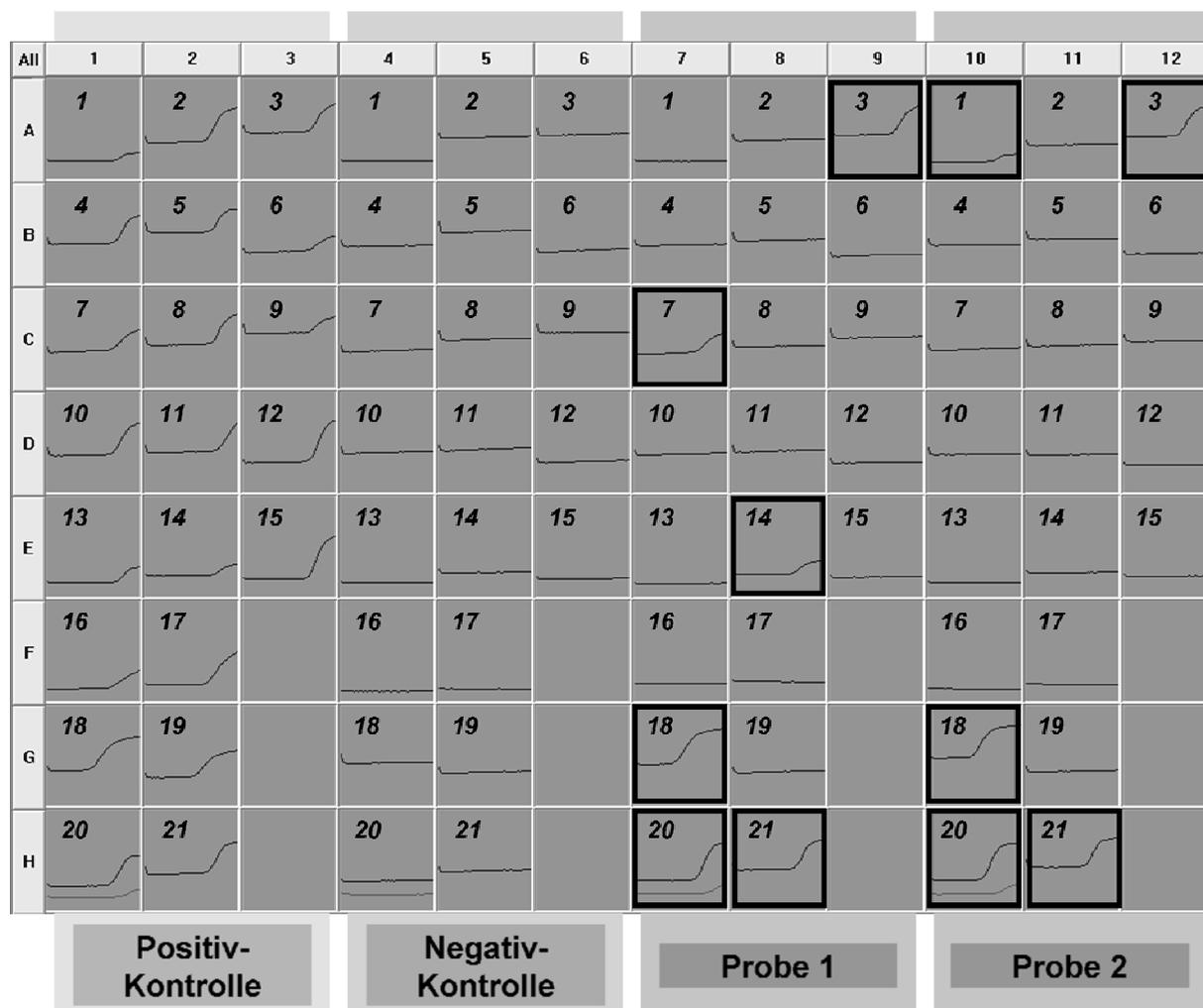


**Abbildung 3:** Plattenlayout des Maismoduls. Im Schema einer 24-Well-Mikrotiterplatte symbolisieren die unterschiedlichen Ziffern die Nachweissysteme, die in den entsprechenden Wells lokalisiert sind. Die komplette Auflistung findet sich rechts. Die drei weißen Wells können noch mit weiteren Nachweissystemen belegt werden.

Den Einsatz mit zwei Routineproben zeigt Abb. 4. Die Fluoreszenzkurven sind hier an den Positionen der zugehörigen Wells aufgetragen. Ganz links befinden sich die Positiv-Kontrollen, die entsprechenden Amplifikationskurven belegen das ordnungsgemäße Funktionieren der Nachweissysteme auf der gesamten Platte. Bei den Negativ-Kontrollen zeigt das Fehlen jeglicher Amplifikationskurven, dass weder die vorgelegten Reaktionsmische noch der zum Verdünnen der Proben verwendete Puffer mit der nachzuweisenden DNA kontaminiert waren. In Probe 1 ließen sich MON 810, GA21 und MON 88017 nachweisen, in Probe 2 NK603 und MON 810. Positiv reagierten dazu noch beide Proben auf das Maisreferenzgen HmgA, sowie die Screeningelemente p35S, tNOS und CTP2-CP4-epsps. Beide Proben enthielten kein Soja, wie aus der entsprechenden negativen Reaktion geschlossen werden konnte. Die Anwendbarkeit der Maismodule mit Routineproben konnte somit demonstriert werden.

Im Rahmen des vorgestellten Projektes wurden vier Modulsysteme für Mais, Soja, Raps und Reis entwickelt, in denen einzelne Real-Time Systeme zum GVP-

Nachweis kombiniert sind. Die Kombination der Reaktionen ermöglicht einen parallelen Nachweis aller für eine Routineprobe relevanten GVP einer Pflanzenspezies in einem Ansatz.



**Abbildung 4:** Anwendung des Maismoduls mit Routineproben. Übersicht über die Fluoreszenzkurven aller Wells einer 96er-Platte. Zwei Routineproben wurden analysiert. Die umrandeten Wells enthalten positive Reaktionen. Die Ziffern entsprechen den in Abb. 3 angegebenen Nachweissystemen. In beiden Routineproben ist das Maisreferenzgen HmgA nachweisbar, was auf das Vorliegen amplifizierbarer DNA hinweist. Die genetischen Elemente p35S, tNOS und CTP2-CP4-epsps deuten auf das Vorhandensein gentechnischer Veränderungen hin. In Probe 1 können die Maislinien MON 810, GA21 und MON 88017 nachgewiesen werden, in Probe 2 die Maislinien NK603 und MON 810.

Die gewonnenen Erkenntnisse fließen direkt in das vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit geförderte Projekt „Entwicklung und Etablierung eines Real-time PCR Analyseformats zum kombinatorischen Screening und zum Nachweis nicht zugelassener gentechnisch veränderter Organismen (GVO)“ ein. In diesem neuen Projekt soll der modulare Ansatz weiter verfolgt werden

und ein kombinatorisches Screeningverfahren besonders für nicht zugelassene GVP entwickelt werden.

## Referenzen

- [1] <http://registerofquestions.efsa.europa.eu/roqFrontend/questionsList.jsf>
- [2] Jahresbericht 2008 des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL):  
[http://www.lgl.bayern.de/publikationen/jahresbericht\\_2008.htm](http://www.lgl.bayern.de/publikationen/jahresbericht_2008.htm)
- [3] <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm>
- [4] <http://www.transgen.de/zulassung/gvo/>





**91058 Erlangen**  
Eggenreuther Weg 43  
Telefon: 09131 764-0



**85764 Oberschleißheim**  
Veterinärstraße 2  
Telefon: 089 31560-0



**97082 Würzburg**  
Luitpoldstraße 1  
Telefon: 0931 41993-0



**80538 München**  
Pfarrstraße 3  
Telefon: 089 2184-0

[www.lgl.bayern.de](http://www.lgl.bayern.de)

**Bayerisches Landesamt für  
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit**  
Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen

Telefon: 09131 764-0  
Telefax: 09131 764-102

Internet: [www.lgl.bayern.de](http://www.lgl.bayern.de)  
E-Mail: [poststelle@lgl.bayern.de](mailto:poststelle@lgl.bayern.de)

Gestaltung & Druck: KAISER MEDIEN GmbH

ISSN 1866-7767      Druck Version      ISSN 1866-7775      Internet Version  
ISBN 978-3-942018-02-9      Druck Version      ISBN 978-3-942018-03-6      Internet Version