

Fachtagung Gentechnik in Oberschleißheim am 25. Oktober 2007

Band 2 der Schriftenreihe

Herausgeber: Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen
Telefon: 09131 764-0
Telefax: 09131 764-102

Internet: www.lgl.bayern.de
E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de
Fotos: Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

Komplettherstellung: Kaiser Medien GmbH, Nürnberg
Stand: Juli 2008

© Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, alle Rechte vorbehalten
Gedruckt auf Papier aus 100 % Altpapier

Bei fachlichen Fragen wenden Sie sich bitte an:

Dr. Ulrich Busch
Telefon: 089 31560-234
E-Mail: ulrich.busch@lgl.bayern.de

ISSN 1866-7767 Print Version
ISBN 978-3-939652-61-8 Print Version

Diese Druckschrift wird kostenlos im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit der Bayerischen Staatsregierung herausgegeben. Sie darf weder von den Parteien noch von Wahlwerbern oder Wahlhelfern im Zeitraum von fünf Monaten vor einer Wahl zum Zweck der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für Landtags-, Bundestags-, Kommunal- und Europawahlen. Missbräuchlich ist während dieser Zeit insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Informationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken und Aufkleben parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist gleichfalls die Weitergabe an Dritte zum Zweck der Wahlwerbung. Auch ohne zeitlichen Bezug zu einer bevorstehenden Wahl darf die Druckschrift nicht in einer Weise verwendet werden, die als Parteinahme der Staatsregierung zugunsten einzelner politischer Gruppen verstanden werden könnte. Den Parteien ist es gestattet, die Druckschrift zur Unterrichtung ihrer eigenen Mitglieder zu verwenden. Bei publizistischer Verwertung - auch von Teilen - wird um Angabe der Quelle und Übersendung eines Belegexemplars erbeten. Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte sind vorbehalten. Die Broschüre wird kostenlos abgegeben, jede entgeltliche Weitergabe ist untersagt. Diese Broschüre wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Für die Inhalte fremder Internetangebote sind wir nicht verantwortlich.



BAYERN | DIREKT ist Ihr direkter Draht zur Bayerischen Staatsregierung. Unter Tel. 089 122220 oder per E-Mail unter direkt@bayern.de erhalten Sie Informationsmaterial und Broschüren, Auskunft zu aktuellen Themen und Internetquellen sowie Hinweise zu Behörden, zuständigen Stellen und Ansprechpartnern bei der Bayerischen Staatsregierung.

Vorwort

Das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) veranstaltete als zentrale Fachbehörde für Gesundheit und Verbraucherschutz des Freistaats Bayern im vergangenen Jahr zum zweiten Mal nach 2005 die Fachtagung Gentechnik.

Die Gentechnologie ist der Überbegriff für alle Methoden, die sich mit der Isolierung, Charakterisierung, Vermehrung und Neukombination von Genen beschäftigen, besonders auch über Artgrenzen hinweg. Dies ist nur möglich durch die Universalität des genetischen Codes, d.h. alle Organismen verwenden die gleiche genetische Sprache. Genetische Informationen werden auch in der Natur zwischen verschiedenen Arten ausgetauscht. Die Gentechnologie als Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhundert spielt mittlerweile eine zentrale Rolle in unserer Gesellschaft. Wo an solchen sensiblen Bereichen der Natur gearbeitet wird, sind geeignete gesetzliche und regulatorische Vorgaben erforderlich, die auch entsprechend kontrolliert werden. Zentrale gesetzliche Grundlage ist in Deutschland das Gentechnikgesetz, das in der aktuellen Novellierung Verfahrensbeschleunigungen für Arbeiten in gentechnischen Anlagen sowie Regelungen zur Gewährleistung der Koexistenz von konventionellen Pflanzen und gentechnisch veränderten Pflanzen umgesetzt hat.

Die Beiträge der zweiten Fachtagung beschäftigten sich insbesondere mit der Kontrolle und Überwachung der Gentechnik und den Ergebnissen des Versuchsanbaues und der Sicherheitsforschung in Deutschland und Bayern. Diese Untersuchungen waren die Grundlagen für die gesetzlichen Vorschriften des Gentechnikgesetzes zum Thema Koexistenz. Die für die Überwachung essentiellen Themenfelder Probenahme und Diagnostik werden im vorliegenden Tagungsband umfassend dargestellt. Bedingt durch die weltweite asynchrone Zulassung bei gentechnisch veränderten Organismen zeigt sich immer mehr die Problematik des Umganges mit Spuren von gentechnisch veränderten Organismen, die die Analytik und Politik vor ganz besonders große Aufgaben stellt.

Mein besonderer Dank gilt dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz, welches uns in bewährter Form bei der Durchführung von wissenschaftlichen Projekten unterstützte und so die Arbeiten auf den Gebieten der Analytik und Sicherheitsforschung erst ermöglicht hat.



Prof. Dr. med. Volker Hingst
*Präsident des Bayerischen Landesamts
für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit*

Erlangen/Oberschleißheim im Mai 2008

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	1
Novellierung des Gentechnikgesetzes	3
Dieter Heublein	
Das neue Gentechnik-Gesetz aus Sicht der Versicherungswirtschaft	9
Rainer Züfle	
Ergebnisse des Erprobungsanbaus von gentechnisch verändertem Mais und Anforderungen für die gute fachliche Praxis	13
C. Ganz ¹ ; C. Struzyna-Schulze ¹ , J. Eder ² ; F. Holz ³ ; W. Mönkemeyer ⁴ , K. Schmidt ⁴ , I. Broer ¹	
Versuchsanbau mit transgenen Maissorten in Bayern	21
Joachim Eder	
Versuche und Erkenntnisse zur Auskreuzung von gentechnisch verändertem Mais im Rahmen der Koexistenz	32
R. Wilhelm, B. Hommel, A. Hüsken, M. Langhof, K. Lipsius*, K. Sabellek*, O. Richter*, G. Rühl, J. Schiemann, P. Wehling	
Probenahme bei nicht zugelassenen gentechnisch veränderten Lebensmitteln	44
Hans-Ulrich Waiblinger	
Probenahme zur Überwachung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) in Futtermitteln	50
Brigitte Roth	
Experimentelle Überwachung von gentechnischen Arbeiten: Entnahme von Proben und Analytik	57
Francisco Moreano	
Codex Alimentarius Guidelines: Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO) im Spurenbereich	67
Marianna Schauzu	
ENGL – Nachweis nicht zugelassener GVO	77
Sven Pecoraro	
Screeningstrategien	81
Rupert Hochegger	
Sequenzpolymorphismen bei endogenen Referenzgenen	90
Daniel Suter	
Nachweis von gentechnisch veränderten Hefen im Rahmen der Weinbereitung	97
Christian von Wallbrunn, Manfred Großmann	
Sicherheitsforschung bei gentechnisch veränderten Pflanzen	104
Annette Block, Ulrich Busch	
Rückverfolgbarkeit von gentechnisch veränderten Rapssorten mit Hilfe von SNP-Biochips ...	114
Peter Westermeier	
Alternative GVO-Nachweismethoden (Co-Extra)	126
Lillian Roth, Hermann Broll	

Novellierung des Gentechnikgesetzes

Dieter Heublein

**Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit
und Verbraucherschutz**

Zusammenfassung

Auslöser für die jüngste Novellierung des Gentechnikrechts ist die EU-Richtlinie über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen (GVO) in die Umwelt (2001/18/EG), die bis zum 17.10.2002 in nationales Recht umzusetzen war. Im Gesetz zur Neuordnung des Gentechnikrechts vom 21.12.2004 wurden zunächst nur Änderungen vorgenommen, die nicht der Zustimmung des Bundesrates bedurften. Unter dem Druck eines angedrohten Zwangsgeldverfahrens trat dann am 17.03.2006 das Dritte Gesetz zur Änderung des Gentechnikgesetzes in Kraft, das sich auf die umsetzungspflichtigen Regelungen der Freisetzungsrichtlinie beschränkte. Die nun anstehende umfassende Novellierung des Gentechnikrechts sieht vor allem gewisse Verfahrensbeschleunigungen für Arbeiten in gentechnischen Anlagen sowie Regelungen zur Gewährleistung der Koexistenz der verschiedenen landwirtschaftlichen Anbauformen (mit gentechnisch veränderten Pflanzen, konventionell, ökologisch) vor. Die Bestimmungen über das Standortregister und zum Ausgleich von Einkommenseinbußen bei benachbarten Landwirten bleiben im Kern unverändert. Ergänzend wird eine Verordnung über die gute fachliche Praxis bei der Erzeugung gentechnisch veränderter Pflanzen geschaffen. Außerdem werden verschiedene Verordnungen sowie das EG-Gentechnik-Durchführungsgesetz geändert.

1. Vorgeschichte und zeitlicher Ablauf

Die Richtlinie über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt (2001/18/EG) war bis zum 17.10.2002 in nationales Recht umzusetzen. Auf Grund von Differenzen zwischen Bundesregierung und Bundesrat wurden in der Novelle vom 21.12.2004 zunächst nur die nicht zustimmungsbedürftigen Fragen geregelt. Dazu gehörten vor allem die Aufteilung der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) in zwei Ausschüsse für geschlossene Systeme sowie für Freisetzung

Fachtagung Gentechnik 2007

und Inverkehrbringen, die Einrichtung eines Standortregisters, die Anforderungen an die gute fachliche Praxis und die Umweltbeobachtung, Kennzeichnungsregelungen sowie die Koexistenz- und Haftungsproblematik.

Unter dem Druck eines angedrohten Zwangsgeldverfahrens trat dann am 17.03.2006 das Dritte Gesetz zur Änderung des Gentechnikgesetzes in Kraft, das sich auf die umsetzungspflichtigen Regelungen der Freisetzungsrichtlinie beschränkte. Neben vielen Detailanpassungen wurden beispielsweise Regelungen zur Umsetzung von Entscheidungen der EU-Kommission (Erlass von Schwellenwerten), zur weiteren Anwendbarkeit des vereinfachten Verfahrens für die absichtliche Freisetzung gentechnisch veränderter Pflanzen gemäß der Kommissionsentscheidung 94/730/EG und zur Unterrichtung der Öffentlichkeit erlassen.

Ein Viertes Gesetz zur Änderung des Gentechnikgesetzes sah lediglich die Verlängerung des vereinfachten Verfahrens um ein Jahr vor; es wurde vom Bundestag nicht aufgegriffen. Am 27.02.2007 billigte dann die Bundesregierung ein Eckpunktepapier zur weiteren Novellierung des Gentechnikrechts, auf dessen Grundlage am 20.07.2007 der Entwurf eines Vierten Gesetzes zur Änderung des Gentechnikgesetzes vorgelegt wurde.

2. Eckpunktepapier

Mit dem Eckpunktepapier wurden folgende wesentliche Ziele der anstehenden Novellierung festgelegt:

- Die Forschung voranbringen,
- die Verwaltungsverfahren pragmatisch gestalten,
- die gute fachliche Praxis definieren,
- die Betroffenen informieren - Transparenz sichern,
- die Haftungsregelungen präzisieren,
- den Naturschutz gewährleisten.

3. Änderung des Gentechnikgesetzes

Allgemeines

Die Ausnahmeregelung des § 2 Abs. 2 GenTG wird auf höhere Organismen, welche in vergleichbarer Weise die Kriterien nach Anhang II Teil B der Richtlinie 90/219/EWG erfüllen und in geschlossenen Systemen angewandt werden, ausgedehnt.

Ferner sollen die beiden Ausschüsse der ZKBS wieder zu einem gemeinsam tagenden Gremium zusammengefasst werden.

Gegenstand öffentlicher Diskussionen waren vor allem auch die Haftungsregelungen des § 36 a GenTG. Strittig war beispielsweise, ob das Wort „insbesondere“ in Abs. 1 als Öffnungsklausel zu interpretieren sei, und ob Abs. 1 Nr. 3 zu einer Privilegierung des ökologischen Landbaus führen könnte. Ferner stand die gesamtschuldnerische Haftung des Abs. 4 in der Kritik. Nachdem eine Anhörung juristischer Experten am 10.05.2007 zu dem Ergebnis kam, dass die angesprochenen Regelungen unschädlich seien, blieb es bei der geltenden Fassung der Haftungsregelungen.

Geschlossene Systeme

Für gentechnische Anlagen, in denen gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt werden sollen, sowie für weitere gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 ist richtlinienkonform ein Anzeigeverfahren vorgesehen.

Freisetzung und Inverkehrbringen

Die „0,5 %-Regelung“ in § 14 Abs. 2a (Übergangsregelung des Art. 12 a der Richtlinie 2001/18/EG) für das zufällige oder technisch nicht zu vermeidende Vorhandensein von GVO, für die eine positive Risikobewertung vorliegt, wird aufgehoben, da die in der Richtlinie vorgesehene dreijährige Geltungsdauer am 18.04.2007 abgelaufen war.

Bei den Vorschriften zum Standortregister in § 16 a GenTG war vor allem der Zugang der Öffentlichkeit zu den Grundstücksdaten des vorgesehenen Anbaus umstritten. Im

Interesse größtmöglicher Transparenz unter Wahrung des Datenschutzes sieht der Gesetzentwurf in diesem Punkt keine Änderung gegenüber der geltenden Regelung vor.

§ 16b GenTG regelt die gute fachliche Praxis beim Umgang mit GVO. Die Vorsorgepflicht entfällt, wenn der Nachbar schriftlich auf seinen Schutz verzichtet oder auf Anfrage die zu seinem Schutz erforderlichen Auskünfte nicht erteilt. Abweichungen von den Vorgaben der guten fachlichen Praxis sind der zuständigen Behörde rechtzeitig vor der Aussaat mitzuteilen. Ferner werden die Anforderungen an den Umgang mit gentechnisch veränderten Pflanzen (GVP), Tieren und sonstigen Organismen sowie Düngemitteln überarbeitet. So müssen Einträge in Nachbargrundstücke, das Entweichen gentechnisch veränderter Tiere und das Eindringen von Tieren in den Haltungsbereich sowie Verluste und Vermengungen bei Beförderung, Lagerung und Weiterverarbeitung vermieden werden.

Die Regelungen zum Standortregister und zur guten fachlichen Praxis gelten nicht für Produkte, die auf Grund eines Gehalts an transgenem Material von weniger als 0,9 % nicht mit einem Hinweis auf eine gentechnisch Veränderung gekennzeichnet werden müssen.

Durch Änderung des § 18 Abs. 2 GenTG in Verbindung mit Ergänzungen in der Gentechnik-Verfahrensverordnung und der Gentechnik- Anhörungsverordnung wird die rechtliche Grundlage für die zeitlich unbefristete Anwendbarkeit des vereinfachten Verfahrens bei Freisetzungsvorhaben geschaffen.

Unbeabsichtigte Auskreuzungen von freigesetzten GVP in herkömmlich oder ökologisch bewirtschaftete Nachbarkulturen haben in der Vergangenheit einerseits zu Vollzugsproblemen und gerichtlichen Auseinandersetzungen geführt, andererseits das Haftungsrisiko für die Pflanzenzuchtforschung erhöht. Zur Lösung dieser Problematik ist nun vorgesehen, dass die zuständige Behörde von einer Anordnung nach § 26 Abs. 1 Satz 1 absieht, wenn das Produkt, das GVO enthält, zur unmittelbaren Verarbeitung vorgesehen und sichergestellt ist, dass es nicht in Lebens- oder Futtermittel gelangt, die GVO nach der Verarbeitung zerstört sind und keine schädlichen Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit oder die Umwelt eintreten.

4. Entwurf einer Gentechnik-Pflanzenerzeugungsverordnung

Eine neue Gentechnik-Pflanzenerzeugungsverordnung soll im Einzelnen den Umgang mit GVP regeln. Sie sieht eine Mitteilung gegenüber dem Nachbarn vor, die spätestens drei Monate vor der Aussaat bzw. Anpflanzung erfolgen und Name sowie Anschrift, Grundstück, Flächengröße, Pflanzenart und -sorte, Bezeichnung und spezifischen Erkennungsmarker der GVP enthalten muss. Wenn die Inverkehrbringensgenehmigung besondere Bedingungen zum Schutz der Umwelt enthält, besteht die Pflicht zu einer entsprechenden Anfrage bei der zuständigen Naturschutzbehörde.

Speziell für Mais wurden Detailregelungen geschaffen: So wird die Nachbarschaft definiert durch einen Umkreis von generell 300 m. Zur Sicherung der Koexistenz ist zwischen gentechnisch verändertem Mais und konventionellen Maisfeldern ein Isolationsabstand von 150 m, gegenüber ökologischem Anbau von 300 m einzuhalten. Bei amtlichen Versuchen sind auch andere Maßnahmen zulässig, wenn dadurch der Austrag von Pollen verhindert werden kann. Die Verordnung enthält ferner spezielle Regelungen zur Überwachung und Beseitigung von Durchwuchs sowie zur Fruchtfolge beim Maisanbau.

Gentechnisch verändertes Saat- und Pflanzgut müssen in geschlossenen Behältnissen und getrennt von nicht gentechnisch verändertem Material gelagert werden. Entsprechend ist transgenes Erntegut in geschlossenen Lagerräumen oder sorgfältig abgedeckt aufzubewahren. Die Behältnisse und Lagerräume sind zu kennzeichnen. Auch der Transport hat in geschlossenen Behältnissen bzw. Fahrzeugen oder sorgfältig abgedeckt zu erfolgen. Verschüttetes Saat-, Pflanz- oder Erntegut ist dem Behältnis wieder zuzuführen bzw. gesondert zu verwerten oder zu vernichten. Einrichtungen, Maschinen und Geräte sind sorgfältig zu reinigen, bevor sie für nicht gentechnisch verändertes Saat-, Pflanz- oder Erntegut eingesetzt werden. Generell ist Durchwuchs zu überwachen und ggf. zu beseitigen. Dies gilt auch für Flächen, die bei der Ernte überfahren wurden oder auf denen vermehrungsfähiges Material verschüttet wurde. Bei einem Wechsel des Bewirtschafters gehen diese Pflichten auf den Nachfolger über. Die Regelungen gelten auch für Flächen, auf denen Düngemittel und andere Stoffe ausgebracht wurden, die vermehrungsfähige GVP enthalten.

In Aufzeichnungen sind Sorte und Schlag, die Aufbringung von Stoffen sowie die durchgeführten pflanzenbaulichen Maßnahmen festzuhalten. Die Aufzeichnungen müssen mindestens fünf Jahre nach Ablauf des Anbaujahres aufbewahrt werden. Sie sind auf Verlangen der zuständigen Behörde vorzulegen.

5. Sonstige Änderungen des Gentechnikrechts

Folgende Rechtsvorschriften werden an die Änderungen in Gentechnikgesetz angepasst bzw. durch neue Regelungen ergänzt:

- Gentechnik-Verfahrensverordnung
- Gentechnik-Anhörungsverordnung
- Gentechnik-Aufzeichnungsverordnung
- Gentechnik-Notfallverordnung
- EG-Gentechnik-Durchführungsgesetz

(Anmerkung: Insbesondere ist darauf hinzuweisen, dass der Bundestag in seinen Beratungen das EG-Gentechnik-Durchführungsgesetz um Regelungen zur Kennzeichnung von Lebensmitteln mit dem Hinweis „ohne Gentechnik“ ergänzt hat.)

Das neue Gentechnik-Gesetz aus Sicht der Versicherungswirtschaft

Rainer Züfle

**Swiss Reinsurance Company, Zürich für den
Gesamtverband der Deutschen Versicherungswirtschaft e.V., Berlin**

Der GDV begrüßt, dass Forschung und Anwendung der Gentechnik in Deutschland durch die Novellierung des Gentechnikrechts befördert werden sollen.

Hinsichtlich der Haftungsregelung bleiben die aus Sicht der Versicherungswirtschaft zum Teil gravierenden Probleme, insbesondere hinsichtlich der offenen Fragen nach dem Umfang der dem Landwirt zurechenbaren Haftung für in der Waren- und Lieferkette zu erwartende Folgeschäden, jedoch ungelöst. Hinzu kommt, dass hinsichtlich einer Koexistenz der verschiedenen landwirtschaftlichen Produktionsmethoden keine ausreichenden und belastbaren Erfahrungen, die für eine Risikokalkulation unerlässlich sind, vorhanden sind. Hinzu kommt, dass die Grüne Gentechnik derzeit in der Öffentlichkeit überwiegend abgelehnt wird, woraus sich für die Versicherungswirtschaft zusätzliche Risiken ergeben. Der GDV sieht sich daher derzeit nicht in der Lage, seinen Mitgliedsunternehmen ein Versicherungsmodell für die Haftungsrisiken der Grünen Gentechnik zu empfehlen.

Verordnung über die gute fachliche Praxis bei der Erzeugung gentechnisch veränderter Pflanzen

Koexistenz ist das erklärte Ziel des neuen Gentechnikgesetzes. Verbindliche Regeln der guten fachlichen Praxis sind wesentliche Basis für eine funktionierende Koexistenz der verschiedenen landwirtschaftlichen Produktionsmethoden. Der GDV begrüßt daher, dass in einer Rechtsverordnung die für die wirtschaftliche Koexistenz relevanten Aspekte der guten fachlichen Praxis bei der Erzeugung gentechnisch veränderte Pflanzen definiert werden sollen. Der GDV unterstützt hierbei insbesondere, dass durch die Regeln der guten fachlichen Praxis sichergestellt werden soll, dass in der Praxis eine wesentliche Beeinträchtigung des Nachbarn grundsätzlich unterbleibt. Bereits die unterschiedlichen bestehenden oder vorgesehenen Vorschriften in den Mitgliedstaaten hin-

sichtlich des Mindestabstandes bei Mais (zwischen 25 und 800 m) deuten jedoch darauf hin, dass der „richtige“ Mindestabstand nach den heute vorliegenden Erkenntnissen nicht bestimmt werden kann. Die konkrete Ausgestaltung der guten fachlichen Praxis liegt im Übrigen derzeit nur für gentechnisch veränderten Mais vor - für andere Pflanzenarten bleibt diese abzuwarten. Darüber hinaus wird durch eine „Öffnungsklausel“ wie in § 16 b Gentechnikgesetz der Nutzen festgelegter Abstandsflächen für die Risikoeinschätzung stark relativiert. Durch die vorgesehene Möglichkeit von den Vorgaben der guten fachlichen Praxis abzuweichen und auf den vorgeschriebenen Abstand damit mit Zustimmung des Nachbarn zu verzichten, dürften sich die zu erwartenden und ohnehin kaum einschätzbaren Kumulationseffekte insbesondere in der Waren- und Lieferkette erheblich erhöhen.

Zu § 36 a Gentechnikgesetz

Wie schon im Eckpunktepapier der Bundesregierung dargestellt, sieht sich die Versicherungswirtschaft - mangels ausreichender und in der Praxis belastbarer Erfahrungen, die für eine Risikokalkulation unerlässlich sind - derzeit nicht in der Lage, Versicherungsschutz für das Haftungsrisiko des Landwirtes, der gentechnisch veränderte Pflanzen anbaut, anzubieten. So fehlen hinreichende praktische Erfahrungen mit der Koexistenz der verschiedenen landwirtschaftlichen Produktionsmethoden. Die zu erwartenden Ansprüche zwischen den Landwirten untereinander können deswegen derzeit nicht eingeschätzt werden. Hinzu kommt, dass die in der Waren- und Lieferkette zu erwartenden Probleme unberücksichtigt geblieben sind. Schäden aus Vermischungen in der Waren- und Lieferkette werden aus Sicht der Versicherungswirtschaft jedoch den Schwerpunkt der zu erwartenden Schäden bilden. Diese können weder in der Frequenz noch der Höhe nach eingeschätzt werden. Insbesondere lassen sich auch die erst im Laufe von einigen Jahren zu erwartenden Kumulationseffekte zum gegebenen Zeitpunkt nicht absehen. Diese betreffen sowohl den Anbau als auch die Waren- und Lieferkette. Neben den mangelnden Erfahrungen mit der Koexistenz der verschiedenen landwirtschaftlichen Produktionsmethoden erschwert die Ausgestaltung der Haftung gemäß § 36 a GenTG die Kalkulierbarkeit und damit die Versicherung der Risiken der Grünen Gentechnik maßgeblich:

a) Festlegung der zum Ausgleichsanspruch führenden Fallgruppen,

§ 36 a Absatz 1

- Der GDV hält es für erforderlich, den offenen Tatbestand der wesentlichen Beeinträchtigung durch eine abschließende Aufzählung zu ersetzen. Ein offener Tatbestand erhöht die Rechtsunsicherheit sowohl für den Landwirt, der sich entscheidet, mit dem Anbau von gentechnisch veränderten Pflanzen einen innovativen Weg zu gehen, als auch für den hinter dem Landwirt stehenden Haftpflichtversicherer. Wenn, wie die juristischen Experten darlegen, keine Fälle benannt werden können, die nicht unter die Aufzählung der Nummern 1 bis 3 fallen, muss diese Rechtsunsicherheit im Sinne eines innovationsfreundlichen Gesetzes beseitigt werden. Dass der vorliegende Entwurf in diesem Punkt hinter der im Eckpunktepapier formulierten Anregung zurückbleibt, ist aus Sicht der deutschen Versicherer enttäuschend.
- Darüber hinaus müsste in § 36 a Absatz 1 Nummer 2 klargestellt werden, dass nur auf Rechtsvorschriften beruhende Kennzeichnungsverpflichtungen für einen Ausgleichsanspruch maßgeblich sein dürfen. Ohne eine entsprechende Klarstellung bestünde die Gefahr, dass die abweichende Terminologie in § 36 a Absatz 1 Nummer 3 zu einer anderen Auslegung führen könnte.
- Auch wenn in der EU-Öko-Verordnung der Schwellenwert von 0,9 % übernommen werden soll, kann es nicht ausgeschlossen werden, dass auf europäischer oder nationaler Ebene künftig auch andere Grenzwerte eingeführt werden. Über die Vorschrift des § 36 Absatz 1 Satz 1 Ziffer 3 könnten solche quasi zu einer Haftungsverschärfung durch die „Hintertür“ führen. Diese Situation erhöht die oben dargestellte Rechtsunsicherheit aus Sicht der Versicherungswirtschaft und erschwert die Kalkulierbarkeit des Risikos zusätzlich.

b) Verschuldensunabhängige Haftung mit Verursachungsvermutung

Die Ausgestaltung der Haftung als verschuldensunabhängige Haftung mit Verursachungsvermutung verschärft die oben beschriebenen Probleme des Versicherers hinsichtlich der Einschätzbarkeit des Risikos maßgeblich. Die Regelung in § 36 a Gentechnikgesetz i.V.m. § 906 BGB führt dazu, dass alle Nachbarn, die GVO anbauen, als Gesamtschuldner haften. Weder der Nachweis eines vorwerfbaren Verhaltens noch eines kausalen Zusammenhanges ist notwendig, um die Ersatzpflicht zu begründen.

Der Landwirt kann allein deswegen in Anspruch genommen werden, weil er GVO anbaut. Die Haftung tritt selbst dann ein, wenn der GVO-Eintrag durch keinen der Nachbarn, sondern etwa durch vom Anspruchsteller verwendetes Saatgut, verursacht wurde. Eine gesetzliche Konkretisierung, dass die gesamtschuldnerische Haftung der Nachbarn nur eintritt, wenn einer der Nachbarn den Schaden nachweislich verursacht hat, wäre daher unbedingt erforderlich. Dies entspräche allgemeinen zivilrechtlichen Grundsätzen und dem Nachbarschaftsrecht. Die Regelung des § 36 a Absatz 4 GenTG wäre zu streichen und stattdessen auf das BGB zu verweisen.

Ergebnisse des Erprobungsanbaus von gentechnisch verändertem Mais und Anforderungen für die gute fachliche Praxis

C. Ganz¹; C. Struzyna-Schulze¹, J. Eder²; F. Holz³; W. Mönkemeyer⁴, K. Schmidt⁴, I. Broer¹

¹ – Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock, Justus-von-Liebig-Weg 8, 18059 Rostock

² – Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Am Gereuth 4, 85354 Freising

³ - Landesanstalt für Landwirtschaft und Gartenbau, Zentrum für Acker- und Pflanzenbau, Strenzfelder Allee 22, 06406 Bernburg

⁴ – Biomath GmbH, Schnickmannstraße 4, 18055 Rostock

Zusammenfassung

Im Erprobungsanbau 2005 wurde der Einfluss von verschiedenen Kulturarten, die als Barriere zwischen gentechnisch veränderten (GM) Maispflanzen und deren isogenen Sorten ausgebracht wurden, auf 11 Anbauflächen in Deutschland untersucht. Die Flächen waren auf drei Bundesländer (Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt und Bayern) verteilt, um die unterschiedlichen klimatischen Bedingungen sowie die Windverhältnisse in die Untersuchungen einzubeziehen. Auf diesen Flächen erfolgte bereits 2004 der Erprobungsanbau, wobei keine Einflussnahme von unterschiedlichen Kulturarten nachgewiesen werden konnte.

Bei den Untersuchungen zum Erprobungsanbau 2005 konnte gezeigt werden, dass Mais als Pollenbarriere besser geeignet ist als andere Kulturarten. Aufgrund der starken Windverhältnisse in allen drei Bundesländern wurden die höchsten Einkreuzungsraten von transgenem Pollen in östlicher Himmelsrichtung detektiert. Zusammenfassend reicht eine 20 – 50 m mit beliebigen Feldfrüchten bestellte Fläche und die Zurechnung der benachbarten ersten 25 m des konventionellen Mais aus, damit die Gehalte an gentechnisch veränderten Material unter dem Schwellenwert von 0,9 % liegen.

Einführung

Die Nutzung von gv-Mais ist seit der gesetzlichen Regelung zum Anbau von gentechnisch veränderten Pflanzen in Europa (2003) möglich (Directive 2001/18/CE; Regulation (EC), 1829/2003, 1830/2003). Der Anbau wurde von Beginn an durch Untersuchungen zur Koexistenz zwischen gv-Pflanzen, konventionellen und ökologischen Beständen begleitet. Dies ist von besonderer Bedeutung, weil die weltweite Aussaat von gentechnisch veränderten Pflanzen stark zunimmt, wobei im Jahr 2005 eine signifikante Steigerung von 17 Ländern (2004) auf 21 Länder (James, 2005) zu verzeichnen war. Auch in den nachfolgenden Jahren bis 2007 stieg die Anzahl der Länder, die gentechnisch veränderte Pflanzen anbauen, weiter an. Die konsequente Einhaltung des Schwellenwerts von 0.9% Transgenanteil im Erntegut kann auf Dauer nur durch wissenschaftlich fundierte Regeln der guten fachlichen Praxis gesichert werden.

In Europa wurden seit der Zulassung mehrere Studien zum Auskreuzungsverhalten von transgenem Mais in konventionellen Mais durchgeführt (z.B. Brookes et al., 2004; Melè 2004; Ma et al., 2004). Erste Untersuchungen zur Ausbreitung von transgenem Pollen in konventionelle Bestände wurden in Großbritannien von Henry et al. bereits in den Jahren 2000-2002 durchgeführt. Während dieser Periode wurden 1152 Proben, verteilt auf insgesamt 55 Felder genommen und mittels Real-Time-PCR untersucht. Eine deutliche Abnahme der Transgengehalte konnte innerhalb der ersten 20 m beobachtet werden.

Ziel des Erprobungsanbaus, der 2004 am Beispiel Bt-Mais der Linie Mon810 in Deutschland an 30 Standorten durchgeführt wurde, (Weber et al., 2007) war die Sammlung von Koexistenzdaten, von denen praxisrelevante Maßnahmen zur Auskreuzungsminimierung und Anbauempfehlungen abgeleitet werden konnten (Weber et al., 2005). Die Ermittlung von GVO-Anteilen im konventionellen Mais erfolgte hauptsächlich durch die Probenahme von Silomaisproben in definierten Abständen zum Bt-Mais. Die GVO-Anteile im Erntegut lagen nach einem 20 m breiten Streifen unterhalb des gesetzlich festgelegten Schwellenwertes von 0,9 %. An acht Standorten wurden Körnermaisproben geerntet. Auch hier lag der Anteil an gv-DNA nach 20 m unterhalb der Kennzeichnungsgrenze. Die Ergebnisse zeigten, dass sich trotz unterschiedlicher Erntemethoden die Auskreuzungsraten kaum voneinander unterschieden. Die Erwartung, dass die GVO-Anteile in den Silomaisproben deutlich geringer ausfallen, wurde nicht erfüllt.

Obwohl 2004 die konventionellen Schläge den transgenen in den meisten Fällen direkt benachbart waren, gab es zwei Standorte, bei denen in Teilbereichen andere Kulturarten als Pollenbarriere dienten (siehe Abbildung 1). Ergebnis war in beiden Fällen eine deutliche Reduktion des Transgenanteils im angrenzenden Mais jeweils unterhalb des Schwellenwerts. Ziel des Erprobungsanbaus 2005 war es, die Ergebnisse dieser Anbauform, die eher der landwirtschaftlichen Praxis entspricht, zu überprüfen. Da der Anbau auf 11 Standorte begrenzt werden musste, wurde das Ernteverfahren vereinheitlicht, unnötige Einflussfaktoren wurden so vermieden. Die nachfolgenden Fragen standen im Mittelpunkt der Untersuchungen:

- Haben andere Kulturarten zwischen dem Bt-Feld und konventionellen Mais-Beständen den gleichen Effekt wie Mais?
- Warum waren beim Erprobungsanbau 2004 die GVO-Gehalte in Silomaisproben nicht niedriger als in Körnermaisproben?
- Beeinflusst die Art der Probennahme das Ergebnis?

Material und Methoden

Die Untersuchungen zur Auskreuzung von gentechnisch verändertem Pollen in konventionellen Mais wurden an 11 Standorten, verteilt auf den Norden (Mecklenburg-Vorpommern), die Mitte (Sachsen-Anhalt) und den Süden (Bayern) Deutschlands vorgenommen. Die Größe der Bt-Mais Felder variierte zwischen 1 – 5 ha, wobei das GM-Saatgut auf dem Event *Mon810* basierte. Dabei handelte es sich um Hybridsaatgut. Umrandet wurden die Bt-Felder mit einem 20- 50 m breiten Streifen verschiedener Feldfrüchte, unter anderem Erbsen, Kartoffeln, Weidelgras, Sommergerste oder eine Straße, dem sich jeweils ein mindestens 60 m breites Feld mit nah isogenem Mais anschloss. Während der regelmäßigen Bonituren der Bestände konnte festgestellt werden, dass die Blühzeitpunkte der transgenen und der nah isogenen Sorten sich optimal überschneiden, so dass eine maximale Fremdbestäubung möglich war.

GM-Sorten	nah isogene Sorte
PR39V17	Sandrina
Kuratus	Gavott

Probenahme und Probenverarbeitung:

Die Probenahme erfolgte, anders als beim Erprobungsanbau 2004, durch Ernte einzelner Kolben in definierten Abständen zum Bt-Feld in Reihen (50 m; 55 m; 75 m) per Hand in allen Himmelsrichtungen (Abbildung 1). Pro Abstand wurden 10 – 13 Kolben geerntet, zu einer Probe vereinigt, getrocknet und auf eine Partikelgröße von 0,5 mm vermahlen. Diese Proben wurden nachfolgend auf Laborproben von 100 g aufgeteilt und der GVO-Anteil sowohl von einem kommerziellen Labor als auch von der Universität Rostock quantitativ bestimmt. Des Weiteren erfolgte die Probenahme von Kolben über die gesamte Spurbreite an vier Standorten in den Abständen 0-10 m und 20-30 m vergleichbar zum Erprobungsanbau 2004 (Abbildung 1).

Neben der Ernte von Körnermais wurden vereinzelt Silomaisproben (5 Standorte) in den gleichen Entfernungen genommen. Durch die parallele Ernte kann der Einfluss der Probenahme auf den bestimmten GVO-Anteil untersucht werden.

DNA-Extraktion und quantitativer GVO-Nachweis:

Die Extraktion großer Mengen DNA aus zertifiziertem Material (5% IRMM (Institute for Reference Materials and Measurement)), das zur Erstellung der Standardkurven benötigt wurde, erfolgte mittels *High Pure GMO DNA Extraction Kit* (Roche). Es stellte sich heraus, dass die gewonnene DNA sehr rein und homogen vorlag. Auch aus den Feldproben wurde mit diesem Kit DNA isoliert.

Der GVO-Anteil in den einzelnen Proben wurde mittels Real-Time PCR bestimmt. Zum spezifischen Nachweis sowie zur quantitativen Bestimmung des GVO-Gehaltes erfolgte die Amplifikation des *hmg*-Gens (*high-mobility-group* Protein) von Mais (*Zea mays*) als Referenzgen und des event-spezifischen Integrationsbereiches der eingebrachten Transgensequenz als Zielgen (*Event* Mon810) (DIN EN ISO 21570). Mit Hilfe der TaqMan™-Sonden, die mit den Fluoreszenzfarbstoffen FAM und TAMRA markiert vorlagen, wurde die PCR in einem iCycler (Biorad) durchgeführt. Interne Kontrolle in jedem Lauf war die 1% IRMM Probe (CRM), die ebenso wie die zu messenden Proben als Dreifachwiederholung eingesetzt wurden.

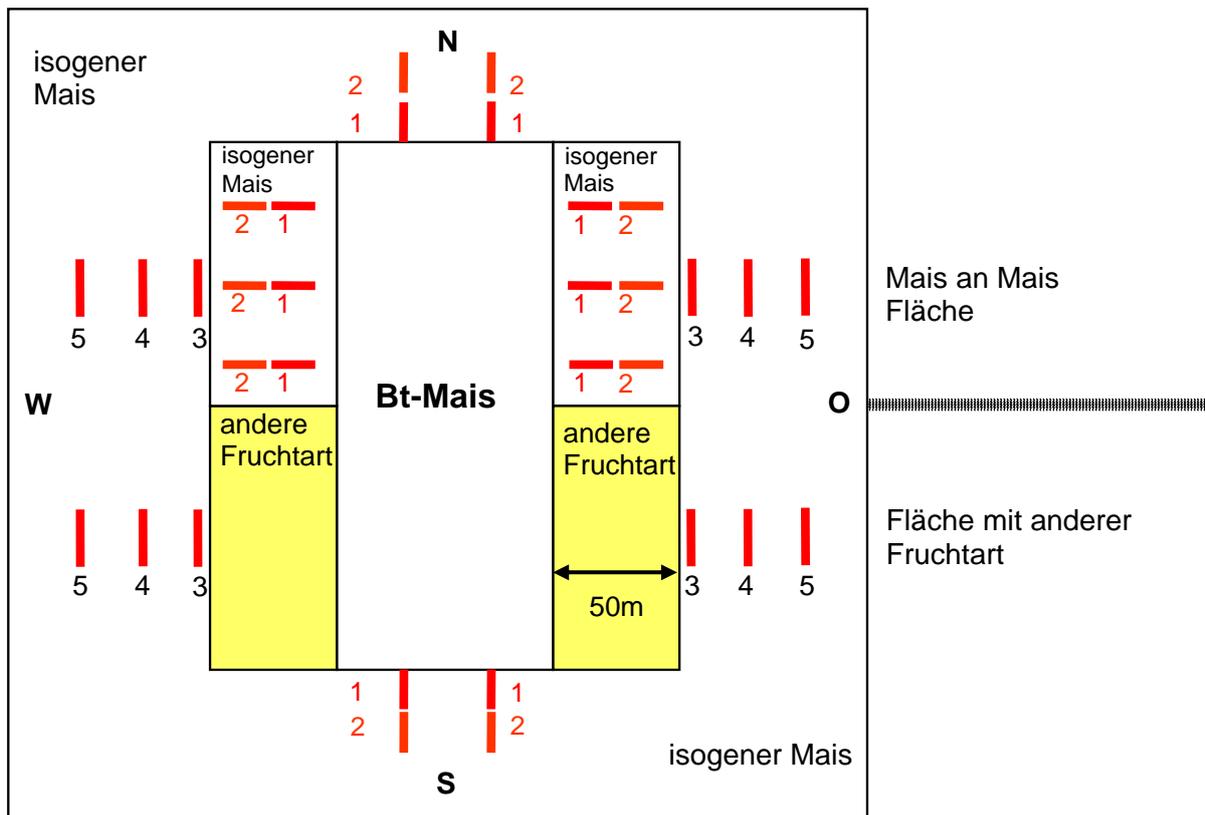


Abbildung 1: schematische Darstellung des Beprobungsplans: (1) 0 – 10 m (Transsekte 1); (2) 20 – 30 m (Transsekte 2); (3) 50 m; (4) 55 m; (5) 75 m

Ergebnisse

1. Haben andere Kulturarten den gleichen Effekt wie Mais?

Die Untersuchungen des Einflusses verschiedener Feldfrüchte als Barriere zwischen GM-Mais und konventionellem Mais waren Hauptbestandteil des Erprobungsanbaus 2005. Dazu erfolgten die Untersuchungen an unterschiedlichen Standorten, verteilt über den Norden, die Mitte und den Süden Deutschlands. Ein Grund für die Standortauswahl lag in den unterschiedlichen klimatischen Bedingungen, deren Einfluss durch die Mittelung der Ergebnisse ausgeschlossen wurde. Des Weiteren lagen in den beteiligten Betrieben durch den Erprobungsanbau 2004 ausreichende Erfahrungen beim Anbau von gentechnisch verändertem Mais vor, die Voraussetzung für wissenschaftlich „saubere“ Ergebnisse sind. Als Ergebnisse des Erprobungsanbaus 2005 konnten deutliche Abhängigkeiten der Auskreuzung von den angebauten Kulturarten, die den verschiedensten Pflanzenfamilien zu zuordnen sind, gezeigt werden. Nach definierten Entfernungen zum Bt-Maisfeld in Abhängigkeit der entsprechenden Kulturarten lagen die Auskreuzungsraten zum Teil früher oder später unterhalb des von der Europäischen Union vor-

geschriebenen Schwellenwertes von 0,9%, wobei der Windrichtung Beachtung geschenkt werden sollte. Bei der Ernte von Kolben in einzelnen Reihen darf der Randeffekt nicht unterschätzt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass ein deutlicher Unterschied zwischen Mais und allen anderen Nachbarfrüchten in der Wirkung als Barriere besteht.

2. Warum waren beim Erprobungsanbau 2004 die GVO-Gehalte in Silomaisproben nicht niedriger als in Körnermaisproben?

Da die Differenz zwischen den GVO-Anteilen in Silo- und in Körnermais 2004 nicht den Erwartungen entsprach (Silomais max. 25% GVO Anteil bezogen auf das Gewicht, da die Transgene nur in den Samen vorhanden sein können, Körnermais max. 50% GVO Anteil bei homozygotem Pollenspender) wurden 2005 zusätzliche Untersuchungen zur Bestimmung des Transgingehaltes in Ganzpflanzen bzw. Silomaisproben vorgenommen, die in gleichen Abständen zum Bt-Mais wie die Körnermaisproben geerntet wurden. Dabei zeigte sich, dass die Unterschiede ausgeprägter waren als 2004, auch wenn sie nicht den oben genannten Erwartungen entsprachen. Diese Differenz ist möglicherweise auf unterschiedliche DNA- Gehalte in Samenzellen im Vergleich zu Zellen aus Blatt und Stängel der Pflanzen zurückzuführen.

3. Wie beeinflusst die Art der Probennahme das Ergebnis?

Welchen Einfluss die Art der Probenahme auf die Transgingehalte der Proben haben kann, wurde im Erprobungsanbau 2005 analysiert. Für die Untersuchungen wurden an drei Standorten Ganzpflanzen entsprechend der Spurbreiten in den Abständen 0- 10 m und 20 – 30 m geerntet und die Transgenanteile mittels Real-Time PCR bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die GVO-Gehalte bei der Ernte von ganzen Pflanzen im Vergleich zu Körnermaisproben deutlich verringert sind. Zusätzlich wurden an einem weiteren Standort Ganzpflanzen in den Abständen 50 m, 55 m und 75 m genommen und ebenfalls mit den Werten der Körnermaisproben verglichen. Auch hier konnte eine Reduktion der GVO-Gehalte nachgewiesen werden. Sowohl bei der Ernte der Körnermaisproben als auch bei den Ganzpflanzen ist ein starker Randeffekt bei einem Abstand von 50 m zu erkennen.

Eine weitere Erntemethode ist die maschinelle Beprobung. Dabei kommt es zu einer starken Durchmischung des Probenmaterials und damit zur Reduzierung des Trans-

gengehaltenes in den untersuchten Proben. An zwei Standorten konnten diese Effekte bestätigt werden.

Der Vergleich der Ergebnisse der Erntemethoden macht deutlich, welchen Einfluss die Beprobung auf die ermittelten Transsengehalte haben kann. So konnten bei der maschinellen Beprobung deutlich geringere Auskreuzungsraten gezeigt werden.

Diskussion

Der Erprobungsanbau 2005 hat gezeigt, dass extreme Witterungsbedingungen dazu führen können, dass der in internationalen Experimenten wiederholt festgestellte Abstand von 20 m bepflanzt mit Mais nicht immer ausreicht, um den Schwellenwert von 0.9 % im Erntegut zu unterschreiten. Unter der Bedingung, dass der größte Anteil des Pollens aus einem GVO-Bestand in einer Richtung in dem konventionellen Bestand verteilt wird, ist nach einer anderen Nachbarfrucht als Mais in einer Breite von 50 m die Kennzeichnung eines angrenzenden 25 m breiten Streifens Mais notwendig, um mit ausreichender Sicherheit von weniger als 0.9 % im Erntegut der nächsten Erntespur ausgehen zu können. Auffällig war, dass die hohen GVO-Gehalte in den jeweils ersten Reihen der konventionellen Bestände gefunden wurden. Es ist also davon auszugehen, dass unter Praxisbedingungen mit maschineller Ernte und der Beprobung von größeren Erntepartien, die eine Mischung mehrerer Erntespuren enthalten, die GVO-Gehalte auch unter ungünstigen Bedingungen in den ersten 25 m im Vergleich zum Erprobungsanbau 2005 drastisch reduziert sein werden. Die Ergebnisse zeigen auch, dass der nicht transgene grüne Anteil der Pflanze im Vergleich zum Kolben einen wesentlich geringeren Beitrag zur Gesamt-DNA in der Probe leistet, als der Gewichtsanteil vermuten lässt. Damit muss beim Vergleich von Transgenanteilen in Proben aus Silomais und aus Körnermais von ähnlichen Auskreuzungsraten ausgegangen werden.

Literatur

Brookes, G.; Barfoot, P.; Melé, E.; Messeguer, J.; Bénétrix, F.; Bloc, D.; Foueillassar, X.; Fabié, A.; Poeydomenge, C. (2004) Genetically modified maize: pollen movement and crop coexistence. Dorchester, UK: PG Economics; <http://www.pgeconomics.co.uk/>

Directive, 2001/18/CE European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms. Official Journal L106 (17/04/2001), 0001-0039

Henry, C.; Morgan, D.; Weekes, R.; Daniels, R.; Boffey, C. (2003) Farm scale evaluations of GM crops: Monitoring gene flow from GM crops to Non-GM equivalent crops in the vicinity. Contract Reference EPG 1/5/138. Final Report 2000/2003 <http://www.defra.gov.uk/environment/gm/research/epg-1-5-138.htm>

James, C. (2005) Global status of commercialized Biotech/GM crops: ISAAA Executive Summary, Brief 34. <http://www.isaaa.org/kc/bin/briefs34>

Ma, B.; Subedi, K.D.; Reid, L.M. (2004) Extent of cross-fertilization in maize by pollen from neighboring transgenic hybrids. *Crop Science* 44; 1273-1282

Melè, E. (2004) Spanish study shows that coexistence is possible. ABIC 3 2 http://www.abic2004.org/download/ABIC2004_newsletter_no.3.pdf

Weber, E.; Bringezu, T.; Broer, I.; Holz, F.; Eder, J. (2005) Coexistence of genetically modified and conventional maize. *Mais* 1+2, 1-6

Weber E.; Bringezu, T.; Broer, I.; Holz, F.; Eder, J. (2007) Coexistence between GM and Non-GM maize crops – tested in 2004 at the field scale level (Erprobungsanbau 2004). *Journal of Agronomy and Crop Science* 193, 79-92

Versuchsanbau mit transgenen Maissorten in Bayern

Joachim Eder

Landesamt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau, Freising

Seit im Jahr 1998 erstmals transgene Maissorten für den Versuchsanbau zur Verfügung standen, hat sich die Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) intensiv mit dieser Materie beschäftigt. Bereits 1999 wurden erste Ergebnisse unter anderem zu Sorteneigenschaften (Eder, 1999), Herbizidresistenz (Gehring, 1999) und auch zu eventuellen Auswirkungen in der Rinderfütterung (Rutzmooser et al. 1999) veröffentlicht.

In den Jahren bis 2007 wurden weitere Untersuchungen zur Praxistauglichkeit transgener Maissorten in Bayern und verschiedene Projekte zur Sicherheitsbewertung durchgeführt (Lang et al. 2006).

Aktuell bearbeitete Projekte sind Untersuchungen zur Persistenz von Bt-Eiweiß im Boden auf Flächen mit langjährigem Anbau (LA), umfangreiche Fütterungsversuchen mit Milchkühen (2007 abgeschlossen), Untersuchungen zur Koexistenz und Pollenverfrachtung bei Mais („Erprobungsanbau“, 2007 abgeschlossen), Versuche zur Praxistauglichkeit schädlingsresistenter Maissorten (Landessortenversuche, LSV), Versuche zur Verbreitung von Bt-Eiweiß über Gülle, Untersuchungen zur Imkerei in Zusammenarbeit mit der Bayerischen Landesanstalt für Wein und Gartenbau, Untersuchungen zur Analytik und Quantifizierung von GVO-Anteilen in transgenen Pflanzen in Zusammenarbeit mit dem Bayerischen Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz sowie ein Projekt zur Umweltwirkung neuer Konstrukte zur Schädlingsresistenz (MON 863) in Kooperation mit der Technischen Hochschule Aachen (2007 abgeschlossen). Die Versuche wurden auf den in Abb.1 dargestellten Versuchsbetrieben der LfL in verschiedenen Landkreisen Bayerns durchgeführt.

Anbau von GVO-Mais auf staatlichen Flächen in Bayern 2007

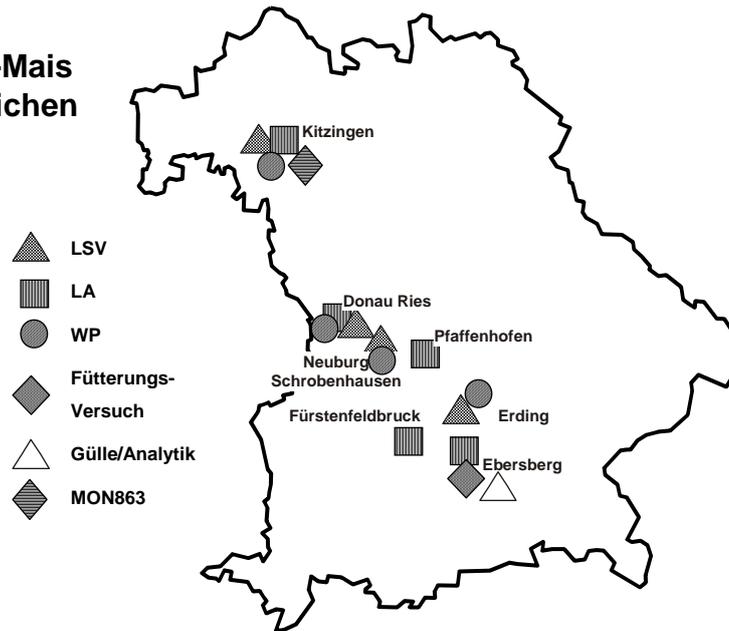


Abb. 1: Der Versuchsabbau wurde 2007 in verschiedenen Landkreisen Bayerns auf staatlichen Versuchsbetrieben durchgeführt. LSV: Landessortenversuch, LA: Daueranbau zur Bodenuntersuchung, WP: Wertprüfungen des Bundessortenamtes, MON863: Untersuchungen zu Umweltwirkungen von MON 863

Sortenprüfungen unter Praxisbedingungen

In der Bundesrepublik Deutschland wurden 2005 erstmals transgene Maissorten für den Anbau in der praktischen Landwirtschaft zugelassen. Eine wichtige Aufgabe im Rahmen der Beratungstätigkeit der LfL für die landwirtschaftliche Praxis ist die Sortenberatung. Um hier entsprechende Empfehlungen aussprechen zu können, werden an verschiedenen Orten Bayerns Sortenversuche durchgeführt, um die Leistungsfähigkeit insbesondere neuer Sorten bewerten zu können und Empfehlungen für die landwirtschaftliche Praxis auszusprechen. In Rahmen dieser Versuche werden seit 2005 auch transgene, schädlingsresistente Sorten auf ihre Anbauwürdigkeit unter bayerischen Verhältnissen geprüft. Bei den bisher auf dem Markt befindlichen Sorten handelt es sich ausschließlich um solche vom Typ MON810 mit einer Resistenz gegenüber dem Maiszünsler, einem Schmetterling, dessen Raupe durch ihren Fraß an den Maisstängeln von Maispflanzen großen Schaden verursachen kann.

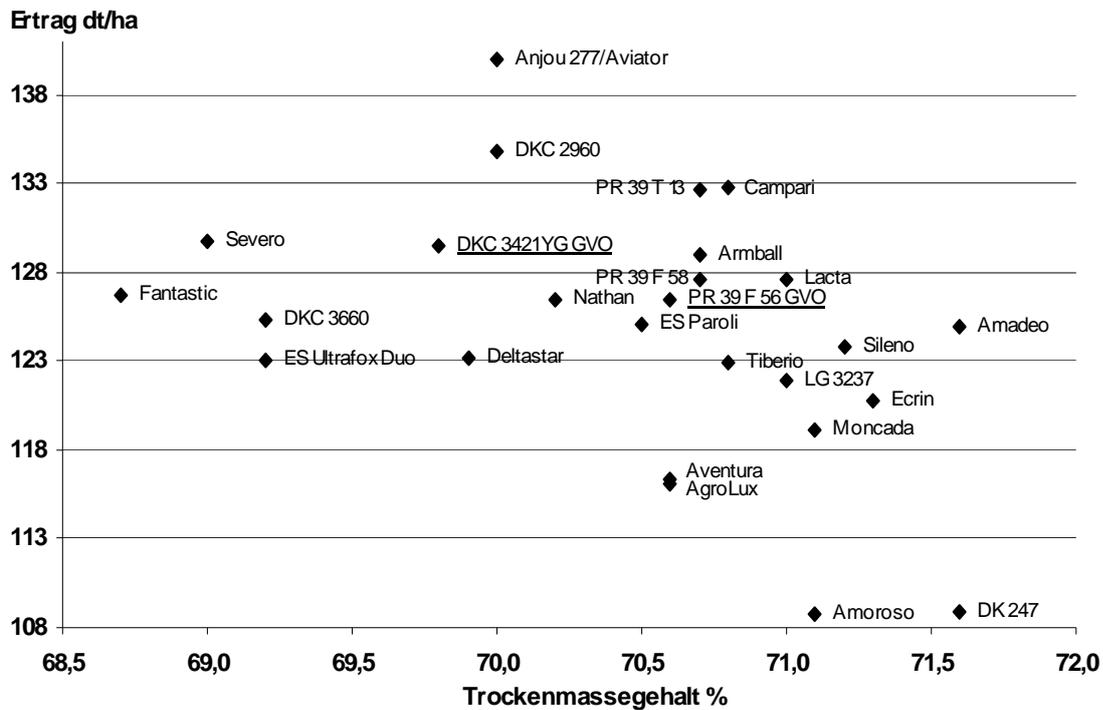


Abb. 2: Die Kornerträge und Trockensubstanzgehalte verschiedener Maissorten in einem Sortenversuch am Standort Euerhausen, Landkreis Würzburg 2006. Die gentechnisch veränderten Sorten sind unterstrichen.

Die Abb. 2 zeigt als Beispiel das Ergebnis eines Sortenversuchs am Standort Euerhausen, Landkreis Würzburg im Jahr 2006. Dargestellt sind die Kornerträge verschiedener Sorten der mittelfrühen Reifegruppe (Reifezahl K230-K250), die für klimatischen Bedingungen dieser Region als optimal anzusehen sind. Weiterhin die Trockensubstanzgehalte der Körner bei der Ernte, ein wichtiges Merkmal, da die Wirtschaftlichkeit des Körnermaisbaus stark von den Trocknungskosten für die Ware beeinflusst wird. In dem Versuch wurden zwei transgene Sorten mit geprüft, die in der Darstellung markiert und mit GVO gekennzeichnet sind. Obwohl in diesem Jahr ein für Bayern deutlich höherer Befall mit den Maiszünsler festzustellen war, der auch in dem Sortenversuch zu erkennen war, brachten die transgenen Sorten keinerlei besondere Vorteile hinsichtlich der dargestellten Parameter. Sie erzielten Erträge auf einem Niveau wie viele andere Sorten auch. Ähnliche Ergebnisse lieferten weitere Versuche in anderen Regionen Bayerns und in den Jahren 2005 bis 2007.

Der Anbau transgener zünslerresistenter Sorten ist somit unter bayerischen Verhältnissen keine wichtige Option zur Schädlingsbekämpfung oder Ertragsabsicherung bei Mais. Der Befall mit dem Schädling ist im Vergleich zu anderen Ländern (z.B. USA) deutlich geringer und kann bei absehbarem Bedarf auch durch den Einsatz von Insekti-

ziden effizient reduziert werden. Besondere Ertragsvorteile gegenüber konventionellen Sorten waren bislang nicht feststellbar. Unter diesen Voraussetzungen und in Anbetracht der mangelnden gesellschaftlichen Akzeptanz solcher Sorten empfiehlt die LfL und die staatliche Beratung derzeit ihren Einsatz in der praktischen Landwirtschaft in Bayern nicht.

Untersuchungen zur Koexistenz

Mit der Zulassung transgener Sorten für den praktischen Anbau in Deutschland ergaben sich auch Fragen hinsichtlich der Verbreitung der Transgene über Maispollen. Durch die Befruchtung mit Pollen, der von transgenen Pflanzen stammt und über den Wind verbreitet wird, kann auch in benachbarten konventionellen Maisbeständen transgene DNA nachgewiesen werden, was dort unter Umständen unerwünscht sein könnte. In Bayern wurde deshalb in den Jahren 2004 bis 2006 durch die LfL ein Versuchsanbau durchgeführt, um solche Sorten nicht nur hinsichtlich ihrer Praxistauglichkeit und Wirtschaftlichkeit unter bayerischen Verhältnissen zu überprüfen, sondern auch um an der Gestaltung von Regeln für eine Koexistenz von transgenen und konventionellen Anbausystemen mitzuwirken.

Im Jahr 2004 beteiligte sich Bayern an dem Projekt „Erprobungsanbau“, das auf 28 Standorten in sieben Bundesländern stattfand. Ziel waren in erster Linie Untersuchungen zur Koexistenz im Verhältnis benachbarter Maisbestände, also Untersuchungen zum Pollenflug und zur Analytik der GVO-DNA-Gehalte in den an den GVO-Mais angrenzenden Beständen. Hierbei wurde im Wesentlichen von einem Felddesign mit dem transgenen Mais direkt neben einer isogenen, nicht transgenen Sorte ausgegangen. (Abb.3) Die Pollenverbreitung wurde an Messpunkten in verschiedenen Entfernungen von der Parzelle mit transgenem Mais gemessen.

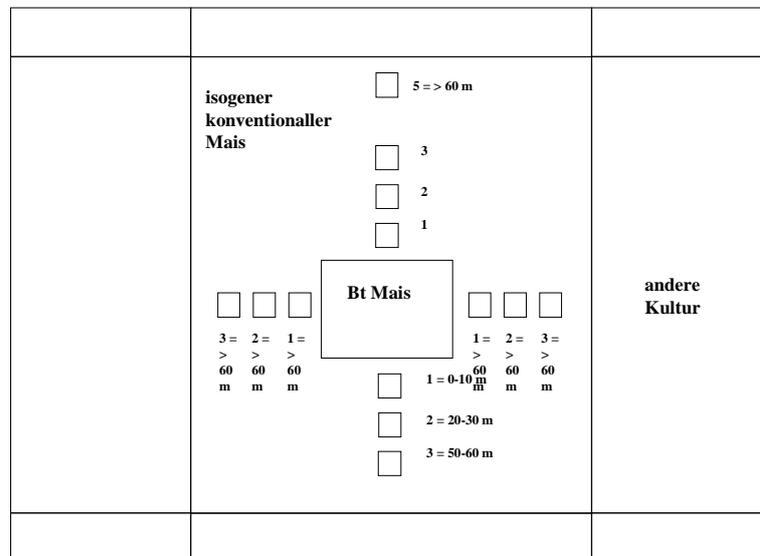


Abb. 3: Design der Feldversuche zur Koexistenz 2004. In einer Mantelsaat aus konventionellem Mais um die GV-Maisfläche herum wurden in verschiedenen Abständen aller vier Himmelsrichtungen Proben gezogen.

Der Erprobungsanbau 2004 hat zur Frage der Einkreuzung von GVO-Sorten in direkt angrenzende Maisbestände umfangreiche und relativ einheitliche Ergebnisse geliefert. Es wurde festgestellt, dass unter den in Deutschland vorherrschenden Bedingungen des Jahres 2004 in einem 10 - 20 m breiten Streifen von konventionellem Mais in direkter Nachbarschaft zu einem zu einer Fläche mit transgenem Mais ein großer Teil der Pollen aufgefangen wurde (Weber et al. 2004, 2007). Als typisches Beispiel ist in Abbildung 4 das Ergebnis des Versuchs am Standort Grub (Landkreis Ebersberg) dargestellt. Während in dem direkt an den transgenen Mais angrenzenden Streifen die Werte für transgene DNA je nach Himmelsrichtung in etwa zwischen 0,5 und 0,8 % lagen, waren bei größerer Entfernung nur noch minimale Spuren vorhanden. Nicht abschließend geklärt werden konnte in dem Programm des Jahres 2004 die Frage der Pollenverfrachtung über andere landwirtschaftliche Kulturen (z.B. Getreide).

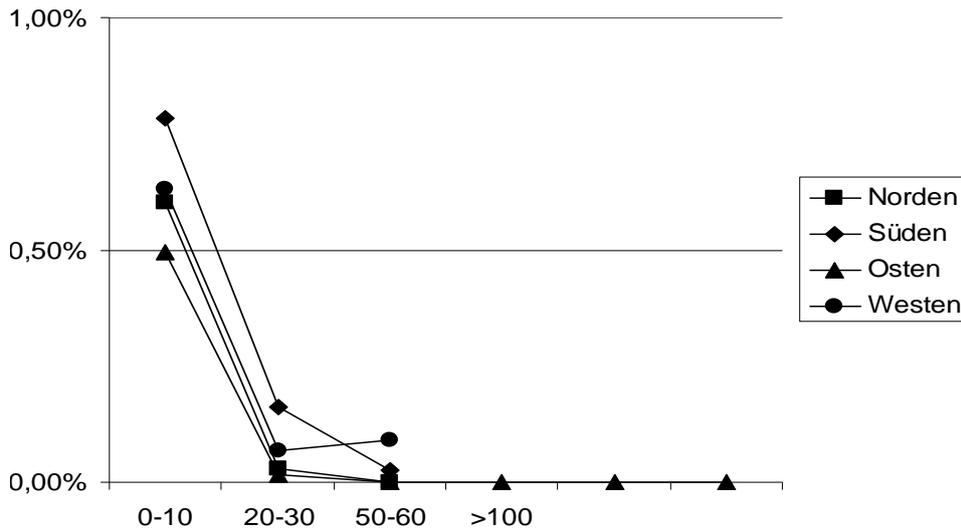
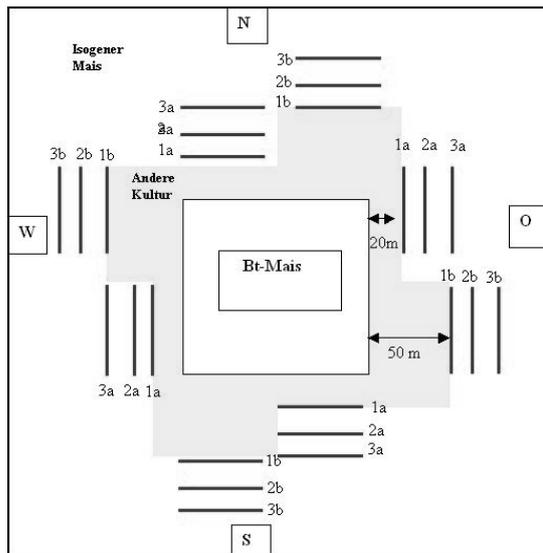


Abb. 4: Ergebnisse zur Auskreuzung von GVO-DNA in verschiedenen Abständen von der GV-Maisfläche am Standort Grub, 2004

Deshalb wurde zu dieser Thematik in Bayern im Folgejahr 2005 ein weiteres wissenschaftliches Vorhaben umgesetzt, zusammen mit den Landesanstalten für Landwirtschaft in Sachsen-Anhalt und Mecklenburg-Vorpommern, koordiniert durch die Universität Rostock. Erkenntnisse weiterer Untersuchungen zur Auskreuzung von transgenem Mais und einige wenige eigene Ergebnisse im Jahr 2004 hatten deutlich gezeigt, dass ein Anbau anderer Früchte (Getreide, Grünland, Kartoffeln) angrenzend an die Maisflächen die Ausbreitung der Maispollen beeinflusst. Zum einen kann es durch eine auf der benachbarten Fläche entstehende Thermik zu einer Verschleppung der Pollen in höhere Luftschichten kommen und damit zu einer Übertragung höherer Konzentrationen auf größere Distanzen, zum andern war davon auszugehen, dass der horizontale Pollenflug durch niedrig wachsende Früchte weniger stark gebremst wird als durch Mais. Diese Fragestellung war die Basis der Untersuchungen des Jahres 2005. Das Design der Versuchsflächen ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Auskreuzung in einen konventionellen Maisbestand über eine Fläche bestellt mit einer anderen landwirtschaftlichen Kultur (z.B. Getreide) sollte im Versuch ermittelt werden. Die Versuche sahen Abstände von 20 und 50 m vor. Zusätzlich sollten die Ergebnisse von 2004 zum Eintrag in direkt aneinander grenzende Maisbestände bestätigt werden. Die Versuchsflächen wurden in Bayern auf den LfL-Versuchsbetrieben Grub, Neuhoof und Baumannshof sowie am Lehr-, Versuchs- und Fachzentrum Schwarzenau angelegt.



Reihenbeprobung

- 1a: 1.Reihe nach 20 m Sommergerste (20 m)
- 2a: 8. Reihe nach 20 m Sommergerste (25 m)
- 3a: 33. Reihe nach 20 m Sommergerste (45 m)
- 1b: 1.Reihe nach 50 m Sommergerste (50 m)
- 2b: 8. Reihe nach 50 m Sommergerste (55 m)
- 3b: 33. Reihe nach 50 m Sommergerste (75 m)

Abb. 5: Versuchsdesign im Jahr 2005 zur Untersuchung der Pollenverfrachtung über verschiedene landwirtschaftliche Kulturen in Maisflächen im Abstand von 20 m und 50 m.

Die Versuche von 2005 lieferten insgesamt deutlich abweichende Ergebnisse zu 2004. Im Gegensatz zum Vorjahr war ein sehr deutlicher Einfluss der Hauptwindrichtung feststellbar. Die Auskreuzung war in diesem Jahr sowohl über Maisflächen, als auch über andere Kulturen in Richtung Osten und Süden – der Wind kam während der Blütezeit Ende Juli hauptsächlich aus Nordwest – im Vergleich zu den anderen Himmelsrichtungen um ein Mehrfaches erhöht.

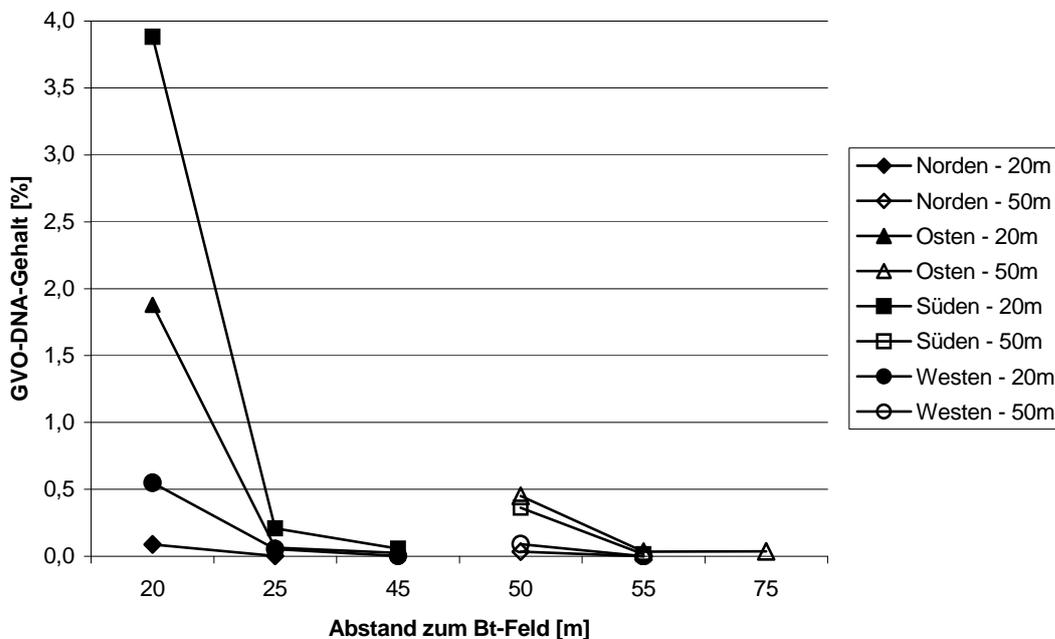


Abb. 6: GVO-Eintrag in der Mantelfläche Grub 2005, Nachbarfrucht: Sommergerste. Abstand von 20 bzw. 50 m zum Bt-Mais .

Noch deutlichere Effekte zeigten sich in einem Versuch mit einem anderen Design am Standort Baumannshof. Hier wurde sowohl der Einfluss der Windrichtung als auch der verschiedener Zwischenkulturen auf der Abstandsfläche untersucht. Es wurden direkt angrenzend an die GV-Maisfläche sowohl konventioneller Mais angebaut, als auch eine Grasfläche einer Breite von 50 m angelegt.

Ähnlich wie in Grub ergaben sich auch hier deutlich höhere Auskreuzungsraten als in 2004 (Abb. 7). Aufgrund der während der Blütezeit vorherrschenden Windrichtung erfolgte so gut wie keine Verbreitung der GV-Pollen in Richtung Westen. Die höchsten Werte ergaben sich Richtung Osten mit ca. 25% GVO-DNA-Anteil in der ersten Reihe, wenn zwischen transgenem und konventionellem Mais die 50 m breite Grasfläche lag. Stand auf der Abstandsfläche Mais, war die Einkreuzung nach 50 m um ein Vielfaches geringer, trotzdem jedoch deutlich über 0,9%. Nach weiteren 5 m nahmen die Werte deutlich ab, aber erst nach 75 m wurde der Kennzeichnungsschwellenwert von 0,9% unterschritten.

Ähnliche Resultate gab es auch in den Versuchen der anderen Bundesländer. Die in 2004 definierten Abstandsflächen von 30 m stellten sich unter den Bedingungen des Jahres 2005 als unzureichend heraus. Sie reichten für eine Unterschreitung des Kennzeichnungsschwellenwertes in der Hauptwindrichtung in mehreren der Versuche aller beteiligten Länder nicht aus. Auf dieser Basis wurde festgestellt, dass ein Abstand von mindestens 100 m vorzusehen sein sollte, um die Auskreuzung in Maisbestände in der Umgebung zuverlässig unter 0,9% zu halten.

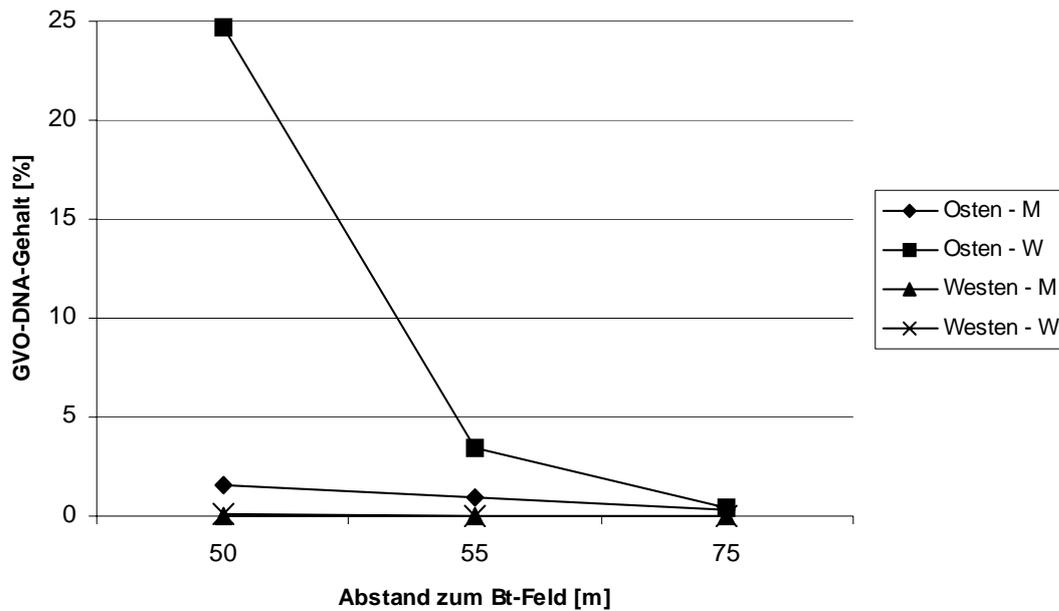


Abb.7: Der GVO-Eintrag im Abstand von 50, 55 und 75 m von der Bt-Maisfläche mit den Zwischenkulturen Mais (M) und Weidelgras (W) Standort Baumannshof

Im Jahr 2006 wurde zur Absicherung der Aussagen der Versuch von 2005 im selben Design nochmals am LfL Versuchsbetrieb in Grub wiederholt. Die Ergebnisse waren ähnlich dem Jahr 2004 (Abb.8). Es zeigten sich in diesem Jahr auch bei geringen Abständen (24 m, Zwischenkultur Gerste) und in der Hauptwindrichtung keine Einträge über dem Schwellenwert von 0,9%. Bei einem Abstand von 48 m waren insgesamt keine quantifizierbaren Werte zu finden. Der höchste Eintrag war mit 0,33 % in westlicher Richtung in der ersten Maisreihe der konventionellen Sorte nach der Fläche mit Sommergerste (24 m Breite) festzustellen. In der zweiten Reihe konnten bei diesem Abstand in einem Fall noch ein quantifizierbarer Wert gemessen werden. Ab der 3. Reihe, also ab 1,5 m im Bestand der konventionellen Sorte, waren keine quantifizierbaren Werte mehr zu ermitteln.

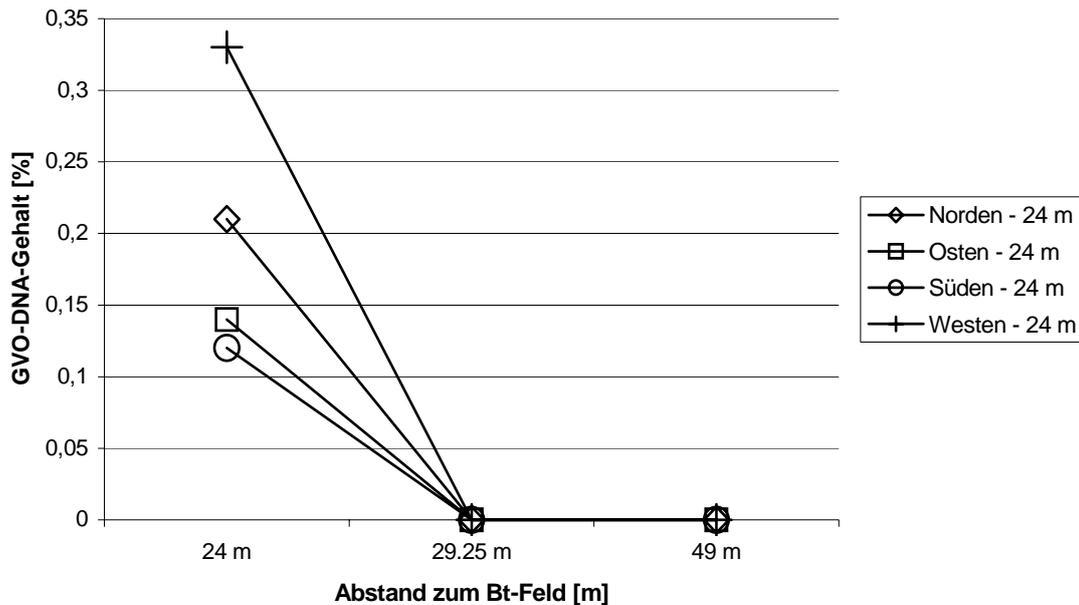


Abb. 8: GVO-Eintrag in der Mantelfläche Grub 2006, Nachbarfrucht: Sommergerste. Abstand von 24 m zum Bt-Mais

Zusammenfassung

Nach drei Jahren Untersuchungen zum Thema Koexistenz beim Anbau von gentechnisch verändertem Mais können zusammenfassend folgende Schlussfolgerungen festgehalten werden:

Klimaeinflüsse, vor allem die Windgeschwindigkeit und Windrichtung haben einen starken Effekt auf die Auskreuzungsrate von Mais in angrenzende oder in der nahen Umgebung befindliche Bestände. Trotzdem wurde in den Versuchen der Kennzeichnungsschwellenwert von 0,9% in den 3 Jahren im Bereich von über 20 m bei direkt angrenzendem Mais nur einmal überschritten. Bei Maisflächen in größeren Abständen kam es in einem Fall zu Einkreuzungen, die erst bei einem Abstand von 75 m (davon 25 m Mais) unterhalb von 0,9% lagen. Der derzeit gesetzlich festzulegende Abstand von 150 m von GV-Mais zu konventionellen Maisbeständen ist somit als in der Regel ausreichend anzusehen, um den Kennzeichnungsschwellenwert in benachbarten Beständen sicher zu unterschreiten. Bei extremen Windstärken sind jedoch erhöhte Einkreuzungswerte auch in größeren Entfernungen nicht auszuschließen. Bei den Versuchen der letzten drei Jahre in Bayern sind solche Verhältnisse nicht aufgetreten. Insofern ist hierzu auch keine Aussage möglich. Die Versuche zu dieser Thematik werden derzeit auf

Länderebene nicht weiter verfolgt. Noch offene Fragen werden in einem umfangreichen Forschungsprojekt durch die Forschungsanstalten des Bundes bearbeitet.

Literatur

Eder J. (1999): Versuche mit gentechnisch veränderten Maissorten- Qualitäts- und Ertragseigenschaften 1998. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau 4, 7-13

Gehring K (1999): Unkrautbekämpfung mit Glufosinatummonium (Liberty) in gentechnischverändertem Mais – erste Erfahrungen. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau 4, 13-19

Lang A., Arndt, Beck R., Bauchenß, Pommer G. (2005): Monitoring der Umweltwirkungen des Bt-Gens. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft 7,2005

Weber, W.E., Bringezu, T., Broer, I., Holz, F. und Eder, J. (2005): Koexistenz von gentechnisch verändertem und konventionellem Mais - Ergebnisse des Erprobungsanbaus zu Silomais 2004. Mais 1, 14-17

Weber, W.E., Bringezu, T., Broer, I., Holz, F. und Eder, J. (2005): Koexistenz von gentechnisch verändertem und konventionellem Mais - Ergebnisse des Erprobungsanbaus Körnermais 2004. Mais 2, 62-64

Weber, E., Bringezu, T., Broer, I., Eder, J., Holz, F. (2007): Coexistence between GM and non-GM maize crops – tested in 2004 at the field scale level (Erprobungsanbau 2004). Journal of Agronomy and Crop Science 193, 79—92

Versuche und Erkenntnisse zur Auskreuzung von gentechnisch verändertem Mais im Rahmen der Koexistenz

R. Wilhelm, B. Hommel, A. Hüsken, M. Langhof, K. Lipsius*, K. Sabellek*, O. Richter*, G. Rühl, J. Schiemann, P. Wehling

**Julius Kühn Institut, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg
(ehemals BAZ, BBA, FAL)**

*** TU Braunschweig, Institut für Geoökologie, 38104 Braunschweig**

Zusammenfassung

Zur Bewertung von geeigneten Maßnahmen der Koexistenz zwischen Gentechnik-nutzender und Gentechnik-freier Landwirtschaft wurden Studien zum Genfluss zwischen Maisfeldern in Abhängigkeit von Isolationsabständen und der Kulturart zwischen den Maisschlägen durchgeführt.

Fünf Feldanlagen mit drei verschiedenen Mais-Sortenpaaren (Bt-Mais/isogene Hybride, Mais mit/ohne molekularem Marker, Gelb-/Weißmais) wurden hinsichtlich des Einflusses von niedrig- (Klee-Gras) und hochwachsenden (Sonnenblumen) Kulturarten untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Einkreuzungsraten zwischen beiden Kulturen gefunden werden. Der Anbau von Pufferzonen mit hochwachsenden Kulturpflanzen ist daher keine generell verlässliche Maßnahme, um die Einkreuzung zwischen Maisfeldern sowie Randeffekte (hohe Einkreuzungsraten am Feldrand) wirksam zu verringern. Randeffekte entstehen daher wohl insbesondere durch das Fehlen von Pollenkonkurrenz.

Bis 2006 wurden sechs Feldanlagen mit Bt-Mais und isogener Hybride an drei verschiedenen Standorten realisiert, um unterschiedliche Abstände (24, 51, 78 m) zwischen Bt-Mais und isogener Hybride auf ihre Wirksamkeit zur Reduktion der Auskreuzung zu prüfen. Windverhältnisse und die Dynamik der Maisblüte beeinflussten die Einkreuzungsraten wesentlich. Dementsprechend war die Variabilität der Einkreuzung zwischen den Jahren und Standorten hoch. Die bisherige Datenlage erlaubt derzeit noch keine Empfehlung eines Mindestabstands. Die Versuche wurden/werden 2007 und 2008 weitergeführt. Die Auswertung wird durch mathematische Modellierung unterstützt.

Einleitung

Mit der Aufhebung des „Moratoriums“ für den Anbau gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP) durch die Europäische Kommission entwickelte sich in den Mitgliedstaaten unabhängig von der Frage der biologischen Sicherheit eine Diskussion über geeignete Maßnahmen, die Koexistenz einer GVP-nutzenden und einer GVP-freien Landwirtschaft zu gewährleisten. Vermischungen können bereits bei der Pflanzenerzeugung z.B. durch Pollenflug und Einkreuzung, Ernterückstände oder Durchwuchs entstehen. Darüber hinaus stellen Transport und Verarbeitung ebenfalls wesentliche Prozesse dar, die zur Beimengung von GVO (gentechnisch veränderte Organismen) in konventionelle pflanzliche Erzeugnisse führen können. Die EG hat 2003 mit dem Erlass einer Koexistenzrichtlinie einen Kennzeichnungsschwellenwert von 0,9% für zufällige und technisch unvermeidbare Anteile von zugelassenen GVO im Erntegut bzw. daraus abgeleiteter Produkte festgelegt (European Communities 2003 a). Für Saatgut gibt es derzeit keinen Kennzeichnungsschwellenwert. Die Festsetzung des rechtlichen Rahmens für koexistenzgewährleistende Bedingungen und Maßnahmen wird derzeit den Mitgliedstaaten überlassen. In einigen Mitgliedstaaten wurden bereits gesetzliche Regelungen zur Koexistenz erlassen. Insbesondere für den Maisanbau setzen die Mitgliedstaaten weitgehend auf die Festlegung von Mindestabständen zwischen GV- (gentechnisch veränderten) Mais und NGV- (nicht-GV) Maisfeldern. Derzeit reichen die in Europa vorgeschriebenen Mindestabstände von 25 m bis 800 m (<http://www.biosicherheit.de/de/koexistenz/513.doku.html>). Erstaunlicherweise beziehen sich diese Regelungen auf dieselben Literaturquellen über Untersuchungen von Auskreuzungen bei Mais (zusammengestellt z.B. bei Sanvido et al. 2005 oder Devos et al. 2005). Daneben gibt es in verschiedenen Mitgliedstaaten und auf europäischer Ebene neuere Forschungsprogramme. Schwachpunkte früherer Untersuchungen sind einerseits die geringen Versuchsfeldgrößen und andererseits die nicht an die EG-Vorgaben angepasste Analytik (Referenzverfahren quantitative PCR). Nur wenige Untersuchungen bezogen sich bisher auf Felder über 1 ha Größe oder gar auf Landschaften mit mehreren Feldern (Banner 2006, Messeguer et al. 2006). Zudem sind die Untersuchungszeiträume und -standorte in den einzelnen Projekten begrenzt, was die Erfassung natürlich gegebener Variationsbreiten (Klima, Topographie etc.) beschränkt. Zwischen den Anbauregionen stellt sich die Frage der Übertragbarkeit der Ergebnisse.

Neben der Festlegung von Mindestabständen listet die Europäische Kommission weitere Maßnahmen für die Gewährleistung der Koexistenz auf (European Communities 2003 b). Geeignete Maßnahmen seien u.U. auch Pollenbarrieren oder Pufferzonen. Praxisgerechte und großflächige Untersuchungen zu diesen Maßnahmen liegen für den Maisanbau jedoch bisher nicht vor. Lediglich aus dem Bereich der Pflanzenzüchtung ist z.B. der Anbau von Hanfstreifen zur Minimierung der Einkreuzung bei anderen Kulturarten bekannt.

Im Auftrag des BMELV führt das heutige Julius Kühn-Institut (ehemals BAZ, BBA, FAL) seit 2005 Feldversuche zur Einkreuzung von Mais durch. Ziel der auf mindestens fünf Jahre angelegten Untersuchungen ist es, praxisrelevante Koexistenz-Maßnahmen für deutsche Anbaubedingungen zu erarbeiten sowie geeignete Empfehlungen für Politik und Landwirte zu geben.

Die Wirkung von hochwachsenden gegenüber niedrigwachsenden Kulturarten zwischen GV- und NGV-Mais zur Reduktion der Auskreuzung wurde in kleineren, der Fragestellung angepassten Feldversuchsanlagen untersucht. Die Bedeutung von Isolationsabständen ist hingegen weder kleinräumig noch an einem Standort und in einem Anbaujahr ausreichend zu untersuchen, da die Variabilität der Standorte und klimatischen Bedingungen hoch ist. Empfehlungen für die Praxis sind daher nur von mehrjährigen Feldversuchen an verschiedenen Standorten abzuleiten. Unterstützt werden diese Untersuchungen durch Arbeiten zur Modellbildung in Kooperation mit der Universität Braunschweig (Lipsius et al. 2007).

Während die Untersuchungen zum Einfluss hoch- und niedrigwüchsiger Kulturarten zwischen GV- und NGV-Mais, die hier zusammenfassend präsentiert werden, abgeschlossen und veröffentlicht sind (Langhof et al. 2008), laufen die großflächigen und mehrjährigen Versuche zu den Isolationsabständen derzeit weiter. Versuchsfrage und –design sowie vorläufige Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt.

Ergebnisse

1. Einfluss hoch- und niedrigwachsender Zwischenkulturen und Randeffekte

Die Untersuchungen zum Einfluss einer hochwachsenden Kultur (Sonnenblume) im Gegensatz zu einer niedrigwachsenden Kultur (Klee-Gras-Gemisch) auf die Einkreuzung in einen Maisbestand wurden mit drei verschiedenen Maissortenpaaren durchgeführt. In zwei Versuchsanlagen wurde ein Farbmarker-Testsystem genutzt, d.h. gelb-

körniger Mais diente als Pollenspender und weißkörniger Mais als Pollenempfänger, in zwei Versuchen wurde ein Bt-Testsystem unter Nutzung von Bt-Mais als Pollenspender und der isogenen Hybride als Pollenempfänger verwendet, und in einer Versuchsanlage wurde ein Testsystem genutzt, das auf dem Vorhandensein eines molekularen Markers im Pollenspender und dem Fehlen dieses Markers im Pollenempfänger beruhte. Die Standardfeldanlage für die Versuche, deren Größe den örtlichen Gegebenheiten ggf. angepasst wurde, ist in den Abbildungen 1 a und 1 b dargestellt. Durch den im Zentrum der Versuchsanlage liegenden Pollenspender sollte eine windrichtungsunabhängige Auswertung der Auskreuzungsraten sowie die Analyse von Randeffekten gewährleistet werden. Für den statistischen Vergleich des Effekts von Sonnenblumen gegenüber Klee-Gras auf die Einkreuzungsrate wurden die Daten der Probenahmepunkte in Hauptwindrichtung genutzt, um den ‚worst case‘ abzubilden. Für die statistische Auswertung wurde daher ein 90°-Sektor in Hauptwindrichtung ausgewählt (s. Abb. 2). Der Effekt der Windrichtung auf die räumliche Verteilung der Einkreuzungsraten war in allen Feldern deutlich zu erkennen (Abb. 2).

Verglichen mit dem Klee-Gras-Gemisch reduzierte die hochwüchsige Sonnenblume die Einkreuzungsraten in den Empfängerbeständen nicht. Die Einkreuzungswerte am Rand der Empfängerblöcke waren auch dann erhöht, wenn davor hochwachsende Sonnenblumen als Puffer angebaut wurden (Tab. 1, Abb. 2). Die drei Testsysteme unterschieden sich in der Synchronisation der Blühphasen (männliche Blüte im Pollenspender und Empfänger, weibliche Blüte im Empfänger). So zeigte die in zwei Versuchsanlagen als Pollenempfänger genutzte Weißmais-Hybride eine ausgeprägte Vorzeitigkeit der männlichen Blüte, die in den anderen beiden Testsystemen nicht beobachtet wurde (Abb. 3). Hohe Einkreuzungsraten korrelieren mit asynchronen männlichen Blühphasen im Pollenspender und –empfänger und gleichzeitiger Synchronie der weiblichen Blüte im Empfänger mit der männlichen Blüte im Pollenspender.

Die Gesamtdaten wurden detailliert in Langhof et al. (2008) dokumentiert.

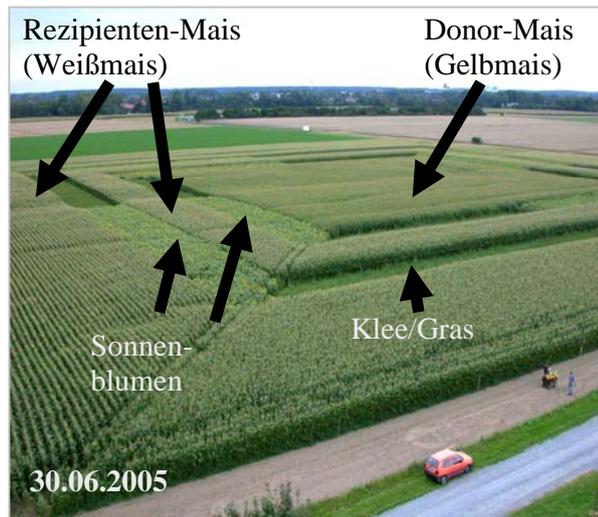
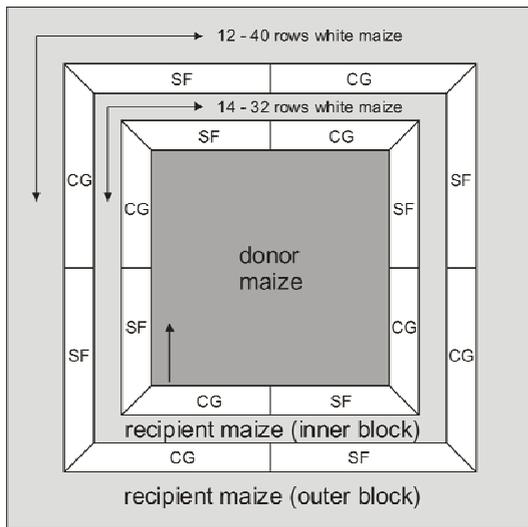
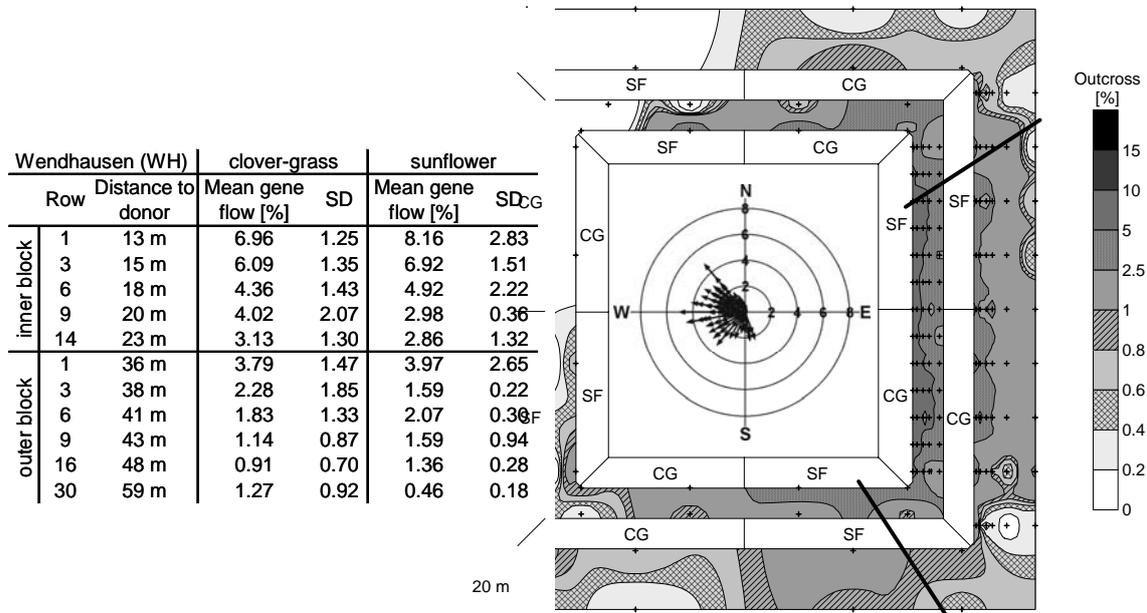


Abb. 1a/b: Feldversuchsanlage zum Einfluss von Klee-Gras (CG) und Sonnenblumen (SF) als Kulturart zwischen zwei Maisschlägen auf die Einkreuzung. (Donor = Pollenspender, hier Gelbmais; Recipient = Pollen-Empfänger, hier: Weißmais)



Tab. 1: Einfluss von Klee-Gras bzw. Sonnenblumen auf die Einkreuzung sowie Randeffekte (vgl. Abb. 1 und 2). Standort Wendhausen, 2005.

Abb. 2: Einkreuzung in den Empfängermais am Standort Wendhausen (2005) bei Klee-Gras (CG) bzw. Sonnenblumen (SF) als zwischenliegender Kulturart. Zentral liegt der transgene Pollenspender. Es sind darin die Windverhältnisse am Standort während der Maisblüte dokumentiert (vgl. Tab. 1, Abb. 1). Die schwarzen Balken zeigen den zur statistischen Auswertung genutzten 90°-Sektor in Hauptwindrichtung an.

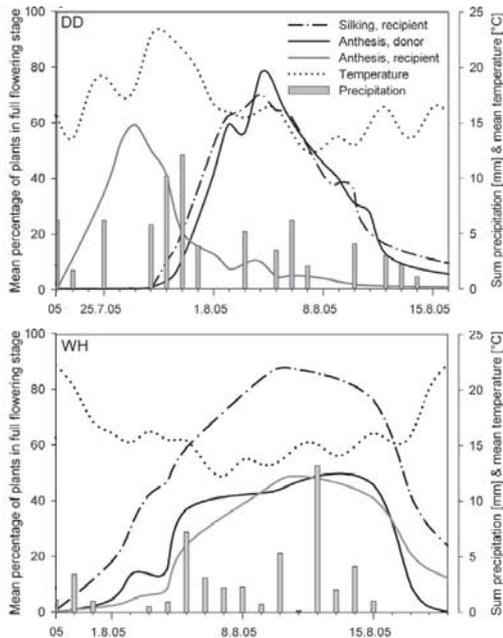


Abb. 3: Blühphasen und Witterungsbedingungen an zwei Versuchsstandorten (DD – Gelbmais/Weißmais; WH – Bt-Mais/NGV-Mais).

2. Untersuchungen zu Isolationsabständen

In mehrjährigen und an drei Standorten Norddeutschlands angelegten Feldversuchen wurden und werden wissenschaftliche Untersuchungen zu Isolationsabständen beim nachbarschaftlichen Anbau von GV- und NGV-Mais durchgeführt, um eine für deutsche Anbaubedingungen repräsentative Abstandsempfehlung geben zu können. Die Variabilität der Einkreuzungsraten wird im Wesentlichen durch die klimatischen Bedingungen während der Maisblüte bestimmt; diese wurden direkt an jedem Versuchsstandort gemessen. Erfasst wurden Windrichtung und -geschwindigkeit, Temperatur, Luftfeuchte und Niederschlag. Außerdem wurden die Blühverläufe in den Pollenspender- und Pollenempfängerefeldern detailliert bonitiert.

Die allgemeine Versuchsanlage zeigt Abbildung 4. Die Einkreuzungsraten in den Empfängerschlagen der Jahre 2005 und 2006 sind exemplarisch für den Standort Wendhausen in Abbildung 5a/b dargestellt. Die Einkreuzungswerte sind an den dem transgenen Pollenspender zugewandten Seiten jeweils am höchsten. Im Vergleich der Jahre werden die unterschiedlich hohen Einkreuzungswerte deutlich, was im Wesentlichen auf die unterschiedlichen Windverhältnisse in den beiden Jahren zurückzuführen ist. Zudem zeigte es sich, dass die Einkreuzungsraten zwar im Mittel mit der Tiefe des

Empfängerfeldes abnehmen, dass jedoch vereinzelt auch in größeren Distanzen erhöhte Einkreuzungsraten auftreten können.

Durch die hohe Anzahl von Messpunkten zur Bestimmung der Einkreuzungsrate in den Rezipientenfeldern ist es möglich, die durchschnittliche Einkreuzung in Teilfeldern verschiedener Größe zu ermitteln (Abb. 6a/b). Die hier dargestellten Ergebnisse der Jahre 2005 und 2006 verdeutlichen die mögliche Variabilität zwischen einzelnen Jahren. Um einen wissenschaftlich fundierten Mindestabstand zu ermitteln, sind Versuchsanstellungen über mehrere Jahre und an mehreren Standorten daher unumgänglich.

Die beschriebene Variabilität der Einkreuzungswerte innerhalb eines Feldes kann auf die Verschiebung der Blühzeitpunkte der Maispflanzen innerhalb des Feldes zurückgeführt werden. Im Versuchsjahr 2006 wurde die Blüte in einem der Versuchsfelder an den Probenahmestellen detailliert erfasst und unter Berücksichtigung der Windverhältnisse mit Hilfe mathematischer Modellierungen die Einkreuzung simuliert (Ansätze zur Modellierung s. Lipsius et al. 2007; Sabellek 2007). Ein Vergleich der Modellvorhersage mit den tatsächlichen Messwerten (Abb. 7 a/b) zeigt eine gute Übereinstimmung sowohl der Werte als auch des Verteilungsmusters im Rahmen der methodischen Messgenauigkeit.

Eine erste umfassendere Auswertung der Ergebnisse aller Feldversuchsanlagen wird nach Vorliegen der Einkreuzungswerte der Jahre 2005 bis 2007 zusammengestellt und veröffentlicht.

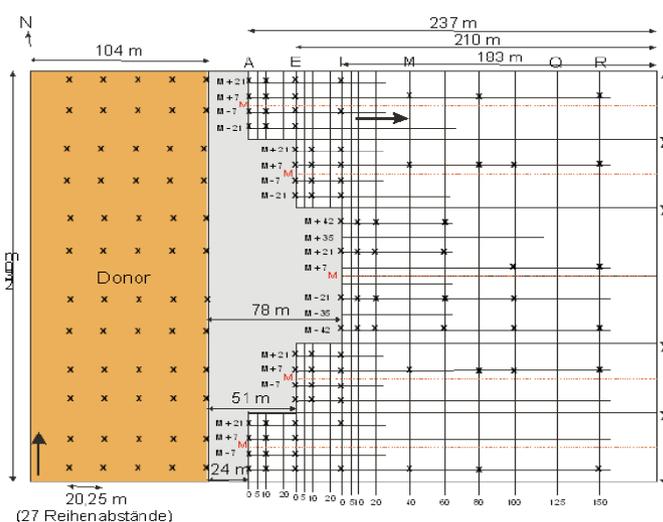


Abb. 4: Schematische Darstellung der Feldversuchsanlage zur Prüfung unterschiedlicher Isolationsabstände (24, 51 und 78 m). Schnittpunkte der horizontalen und vertikalen Linien kennzeichnen die Kolben-Probenahmepunkte für die PCR-Analytik. Die Kreuze stellen die Blühboniturpunkte im Donor- und Rezipientenfeld dar.

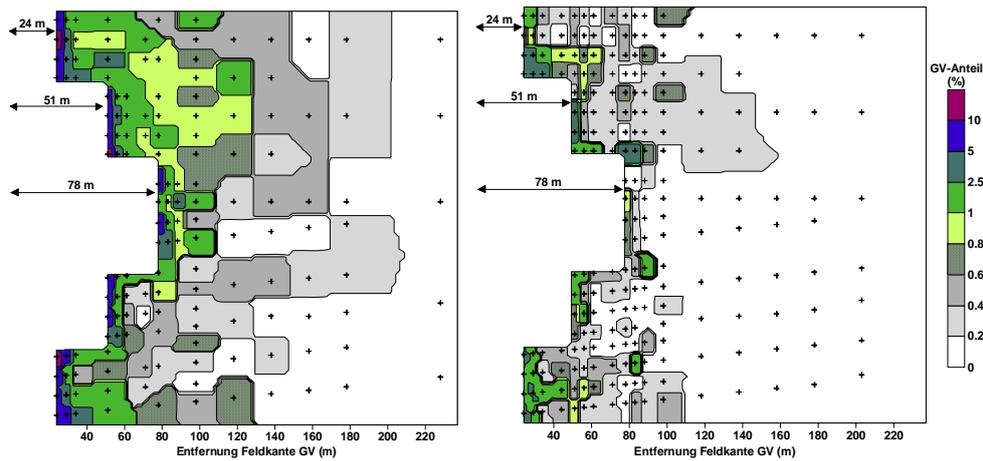


Abb. 5a/b: Einkreuzungsraten am Standort Wendhausen in zwei aufeinander folgenden Jahren (links 2005, rechts 2006). Der transgene Pollen-Donor ist hier nicht eingezeichnet. Die Feldanlagen entsprechen dem Schema in Abbildung 4.

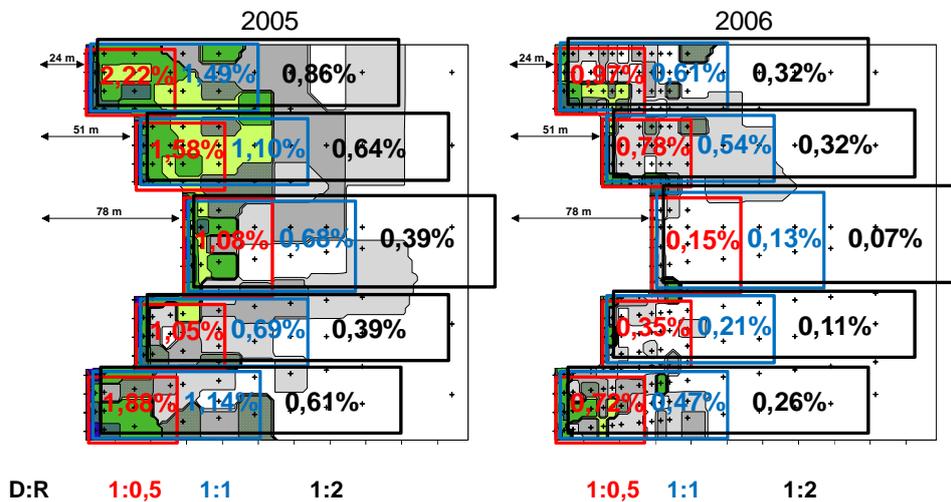


Abb. 6a/b: Einteilung des Versuchsfeldes in Wendhausen in Teilfelder unterschiedlicher Größe und Angabe des durchschnittlichen GV-Anteils in der Ernte bei unterschiedlichen Größenverhältnissen zwischen Donor (D, Feldbreite 104 m) und Rezipient (R). Links: Aufteilungsschema und ermittelte Durchschnittswerte des Jahres 2005, rechts: 2006.

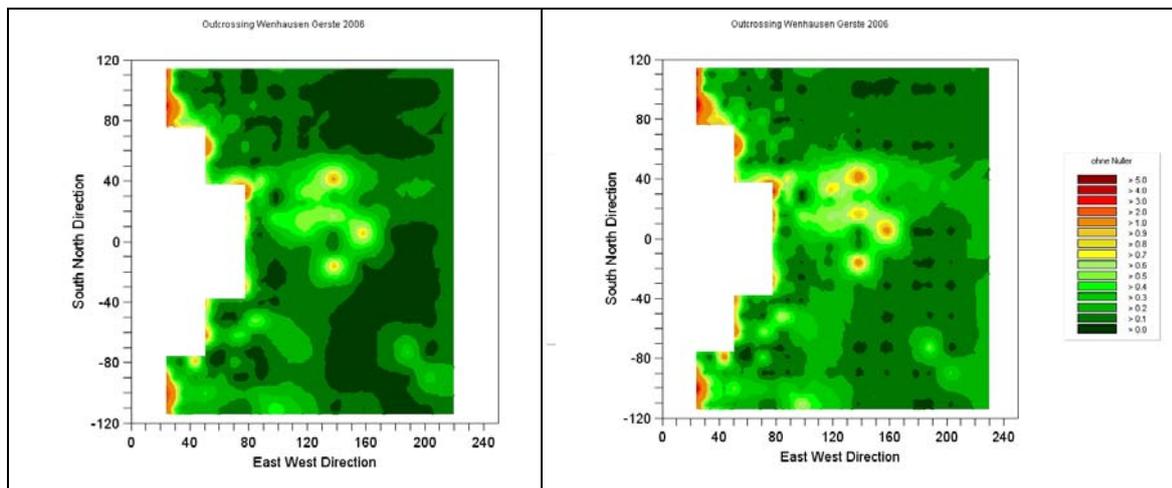


Abb. 7: Vergleich der gemessenen (qPCR) Einkreuzungsergebnisse (links) mit denen einer Simulation (rechts) am Standort Wendhausen (2006) auf Basis der Witterungs- und Blühdaten. Testsystem mit Bt-Mais als Pollenspender (vgl. Abb. 4).

Diskussion

Transgener Mais wird in der EU seit 1998 kommerziell angebaut und auch in Deutschland findet seit 2005 ein begrenzter Anbau von Bt-Mais statt. In der Vergangenheit wurden mehrere Arbeiten zum Pollen-vermittelten Genfluss beim Mais veröffentlicht. Motivation früher Untersuchungen war die Sicherung des Züchtungserfolgs und der Saatgutreinheit bei der Saatgutproduktion. Erste Vorschläge zu Isolationsabständen wurden in diesem Zusammenhang veröffentlicht (Review s. Sanvido 2005). Mit den europäischen Regelungen zur Koexistenz von transgenen und nicht transgenen Kulturarten wurde die Thematik der Auskreuzung sowie erforderlicher Isolationsabstände erneut aufgenommen.

Mais ist eine vorwiegend windbestäubte Kulturart. Hinsichtlich des Pollentransports sind weitere Mechanismen – z.B. Übertragung durch Insekten – weitgehend ausgeschlossen. Meteorologisch-physikalische Prozesse, die für den Transport die bedeutende Rolle spielen, sind beschrieben (Lipsius et al. 2007, Loos et al. 2003, Aylor et al. 2003). Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen wurden daher als wichtige, die Einkreuzung unmittelbar beeinflussende Faktoren die Klima- (Wind, Temperatur, Feuchte, Niederschlag) und Blühdaten erfasst. Eine direkte Ermittlung der Pollenmengen wurde nicht vorgenommen, da das Ziel der Untersuchungen auf der Bestimmung der tatsächlichen Einkreuzungsraten liegt und eine Unterscheidung von Pollen aus dem Spender-

und Empfängerfeld sehr arbeitsaufwendig und unsicher (qPCR) ist. Annahmen zur tatsächlichen Pollenschüttung sollen ggf. per Simulation überprüft werden.

Aylor (2004) schätzt die Lebenszeit der Maispollen auf wenige Stunden. Sie sind besonders anfällig gegenüber Austrocknung; ihre Fertilität und Konkurrenzkraft nimmt mit der Zeit rasch ab. Praktische Bedeutung hat die geringe Lebensdauer der Pollen bei Transport über größere Entfernungen, da Einkreuzungsraten niedriger ausfallen können als bei reiner Pollendispersion zu erwarten wäre. Aus den bisherigen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass Windverhältnisse und die räumlich-zeitliche Dynamik der Blüte in den benachbarten Feldern eine hinreichende Erklärung für die beobachteten Einkreuzungsraten und –muster bieten. Aufgrund der Unvorhersagbarkeit von klimatischen Bedingungen und des Blühverlaufs für definierte Standorte und Anbaujahre sind Vorhersagemodelle, die es dem einzelnen Landwirt ermöglichen, exakte spezifische Feldplanungen (z.B. Lage des Bt-Schlages) vorzunehmen, nicht realisierbar. Die seit 2005 durchgeführten und zukünftig geplanten Feldversuche ermöglichen es aber, die Variabilität der Anbausituationen abzuschätzen und auch Extremsituationen zu definieren, die den Empfehlungsrahmen für Koexistenzmaßnahmen abstecken. Der Einsatz von mathematischen Simulationsmodellen kann ebenfalls unterstützend genutzt werden, eine verallgemeinernde Einschätzung von Maßnahmen zu gewinnen.

Neben quantitativen Abschätzungen und Vorhersagen dienen die durchgeführten und durchzuführenden Feldversuche auch der Bewertung allgemeiner Vorschläge zur „guten fachlichen Praxis“ beim Anbau von Bt-Mais. Es konnte mit großflächigen Feldversuchen gezeigt werden, dass beim Anbau von Mais die Anpflanzung einer hochwachsenden Kultur (Sonnenblume) keine allgemein nutzbare mindernde Auswirkung auf die Einkreuzung hat. Lediglich Mais als Pufferanpflanzung zeigt einen Effekt (s. Einkreuzung im Empfängerfeld bei gleichen Entfernungen vom Donor aber unterschiedlichen Isolationsabständen der Teilfelder in Abb. 5), der sich aus der Pollenkonkurrenz, also der relativen Häufigkeit des transgenen Pollens, ableiten lässt. In weiteren Feldversuchen wird vom JKI daher die Effizienz von Mais-Mantelsaaten am GV-Feldrand untersucht.

Methoden

Die hier angesprochenen Methoden sind detailliert bei Langhof et al. 2008 beschrieben.

Drei Testsysteme wurden zur Analyse des Genflusses untersucht: Bt-Mais (MON810, Pollenspender hemizygot transgen), Mais mit Polymorphismus bezüglich eines molekularen Markers (Pollenspender heterozygot) und Mais mit Polymorphismus der Körnerfärbung (Pollenspender und –empfänger homozygot). Einkreuzungen von MON810 sowie dem molekularen Marker wurden mittels qPCR (=rt PCR), der Farbpolymorphismus visuell über die Körnerfarbe bestimmt. Für die Untersuchungen wurden Sortenpaare mit ähnlichen Reifegruppen genutzt.

Wetterdaten wurden während der Blühperiode an jedem Feldversuchsstandort detailliert aufgezeichnet. Temperatur und relative Luftfeuchte wurden stündlich mit einem Thermohygrographen gemessen. Niederschlag wurde mit Hellmann-Niederschlagsmessern bestimmt. Windstärke und -geschwindigkeit wurden mit einem Windmesser nach Woelfle aufgezeichnet. Sämtliche Wetterdaten wurden durch den Deutschen Wetterdienst erhoben.

Blühphasen wurden über den Verlauf der Blüte an den verschiedenen Probenahmepunkten an jeweils 20 Pflanzen in ein- bis dreitägigen Intervallen bonitiert. Die Erhebungen erfolgten vormittags. Die männliche Vollblüte war definiert als Zeitpunkt, zu dem die Antheren an 75% der Rispenäste geöffnet waren und Pollen schütteten, die weibliche Vollblüte war bei voller Exposition der Seide erreicht.

Zur Bestimmung von Einkreuzungsraten wurden an jedem Probenahmepunkt 20 Kolben geerntet, getrocknet und gerebbelt. Die Körner wurden gemischt und in eine Analyse- und eine Rückstellprobe geteilt. Jeweils 3000 Körner wurden für die PCR-Analytik eingesetzt; dies ermöglichte die Quantifizierung des GV-Anteils bis zu einer Bestimmungsgrenze von 0,1% Donor-DNA mit einem 95% Konfidenzintervall (ISTA, 2006). Die Anzahl gelber Körner an Weißmaiskolben wurde visuell bestimmt.

Einkreuzungsdaten wurden mit dem Programm Surfer Version 8.00 (Golden Software Inc., Golden, CO) mittels der Nearest Neighbour-Methode interpoliert und in Konturplots graphisch dargestellt. Die statistische Auswertung der Einkreuzungsraten erfolgte mit

dem Statistikprogramm SAS Version 9.1 (SAS Institute, Cary, NC), die der Winddaten mit Oriana 2.0 (RockWare, Golden, CO). Der Effekt von Klee-Gras gegenüber Sonnenblumen auf die Einkreuzungsraten wurde mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest untersucht. Die Einkreuzung in Maisreihen in gleicher Entfernung vom Donor mit Klee-Gras oder Sonnenblumen als Zwischenkultur wurde mittels t-Test verglichen.

Literatur

- Aylor, D. 2004. Survival of maize (*Zea mays*) pollen exposed in the atmosphere. *Agric. For. Meteorol.* 123: 125-133.
- Aylor, D., N. Schultes, E. Shields. 2003. An aerobiological framework for assessing crosspollination in maize. *Agric. For. Meteorol.* 119: 111–129.
- Bannert, M. 2006. Simulation of transgenic pollen dispersal by use of different grain colour maize. Diss. ETH No. 16508, ETH Zürich, Schweiz.
- Devos, Y., D. Reheul, A. De Schrijver. 2005. The co-existence between transgenic and non-transgenic maize in the European Union: A focus on pollen flow and cross-fertilization. *Environ. Biosafety Res.* 4:71–87.
- European Communities. 2003a. Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. *Off. J. Eur. Union L* 268:24–28.
- European Communities. 2003b. Commission Recommendation 2003/556/EC of 23 July 2003 on guidelines for the development of national strategies and best practices to ensure the coexistence of genetically modified crops with conventional and organic farming. *Off. J. Eur. Union L* 189:36–47.
- ISTA. 2006. Statistical tools for seed testing. Available at http://www.seedtest.org/en/statistical_tools_for_seed_testing_content---1--1143--279.html (Stand 31. Okt. 2007). International Seed Testing Association, Bassersdorf, Schweiz.
- Langhof, M., B. Hommel, A. Hüsken, J. Schiemann, P. Wehling, R. Wilhelm, G. Rühl. 2008. Coexistence in Maize: Do Non-maize Buffer Zones Reduce Gene Flow between Maize Fields? *Crop Sci.* 48:305–316.
- Lipsius, K., R. Wilhelm, O. Richter, K.J. Schmalstieg, J. Schiemann. 2006. Meteorological input data requirements to predict cross-pollination of GMO Maize with Lagrangian approaches. *Environ. Biosafety Res.* 5: 151–168.
- Loos, C., R. Seppelt, S. Meier-Bethke, J. Schiemann, O. Richter. 2003. Spatially explicit modelling of transgenic maize pollen dispersal and cross-pollination. *J. Theor. Biol.* 225: 241–255.
- Messeguer, J., G. Peñas, J. Ballester, M. Bas, J. Serra, J. Salvia, M. Palau-del-màs, E. Melé. 2006. Pollen-mediated gene flow in maize in real situations of coexistence. *Plant Biotechnol. J.* 4:633–645.
- Sabellek, K. 2007. Abhängigkeit der Auskreuzungsrate von den Inhomogenitäten der Blühphasen im Maisfeld. (Diplomarbeit). TU Braunschweig, Deutschland.
- Sanvido, O., F. Widmer, M. Winzeler, B. Streit, E. Szerencsits, F. Bigler. 2005. Koexistenz verschiedener landwirtschaftlicher Anbausysteme mit und ohne Gentechnik. Schriftenreihe der FAL 55. Agroscope FAL Reckenholz, Zürich, Schweiz.

Probenahme bei nicht zugelassenen gentechnisch veränderten Lebensmitteln

Hans-Ulrich Waiblinger

**Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg, Bissierstr. 5,
79114 Freiburg**

Einleitung und Problemstellung

Bei der Untersuchung auf gentechnische Veränderungen ist eine Probenahme möglichst früh in der Produktionskette, z.B. im Rahmen der Einfuhr oder nach der Ernte, oft besonders effektiv. So können im Falle von Kontaminationen durch gentechnisch veränderte Pflanzen (gv, GVP) Maßnahmen der Überwachung rechtzeitig vor der weiteren Verarbeitung erfolgen; auch ist oft eine präzisere Bewertung bezüglich der Einhaltung von Kennzeichnungsgrenzwerten (Quantifizierung) möglich.

Andererseits muss bei der Untersuchung von stückigem pflanzlichem Erntegut oder sonstigen körnigen Materialien gewährleistet sein, dass die Laborprobe die gesamte Rohwarecharge repräsentiert, in welcher gv Partikel (Samen, Körner) mehr oder weniger homogen verteilt sein können.

Im Jahr 2006 wurde in US-Langkornreis der nicht-zugelassene Reis Event LL601 nachgewiesen. Die Größenordnung der Verunreinigung durch gv-Reis wurde zumeist auf 0,005 bis 0,05 % geschätzt. Da für nicht zugelassene GVO in der EU die Nulltoleranz gilt, dürfen auch sehr geringe Anteile nicht nachweisbar sein.

Im Zuge der umfangreichen, europaweiten Untersuchungen von Reisproben zeigte sich, dass das Probenahmeverfahren und insbesondere die Größe der zur Untersuchung eingesetzten Probe, entscheidenden Einfluss auf die Nachweisbarkeit geringer Spurenverunreinigungen hat. Zur Vermeidung uneinheitlicher Ergebnisse hat die EU-Kommission daraufhin eine Vorgehensweise bei der Untersuchung auf Verunreinigung durch nicht zugelassenen LL 601 Reis empfohlen [KOMMISSIONSENTSCHEIDUNG 2006/757].

In diesem Beitrag sollen die Problematik sowie der aktuelle Stand der Erarbeitung eines Probenahmeschemas zur Untersuchung auf nicht zugelassene GVP dargestellt werden.

Existierende Vorgaben zur Probenahme

Probenahmenvorschriften bzw. -Empfehlungen zur Untersuchung auf gentechnische Veränderungen wurden von der EU-Kommission [KOMMISSIONSEMPFEHLUNG 2004/787] sowie vom europäischen Normungsinstitut [PRCEN/TS 15568] veröffentlicht. Die Arbeitsgruppe „Überwachung gentechnisch veränderter Lebensmittel“ des ALS hat, basierend auf den vorhandenen Standards und Empfehlungen ein Probenahmeschema für die Praxis erarbeitet [ALS-AG, 2007]. Es soll insbesondere bei der Beprobung unverpackter oder gesackter pflanzlicher Rohprodukte auf Basis von Soja, Mais und Raps in Öl- und Getreidemühlen, bei Verarbeitern, Herstellern, Großhändlern, Großverteilern oder Importeuren angewendet werden.

Nach den Empfehlungen der Vornorm prEN 15568 soll die Größe der Laborprobe mindestens 10.000 Partikeln betragen. Bei homogener Verteilung können damit Anteile von GVP-Partikeln ab 0,03% mit hinreichender Sicherheit ($p=95\%$) detektiert werden [SeedCalc 7.1].

Spurenkontaminationen durch nicht zugelassenen gv-Reis in Langkornreis

Sehr bald nach Bekanntwerden der Verunreinigung von US-Langkornreis durch nicht zugelassenen gv Reis des Events LL601 wurde auch publik, dass zumeist von sehr niedrigen Verunreinigungen in einer Größenordnung von 0,005 bis 0,05 % auszugehen ist. Die semiquantitativen Abschätzungen in positiv getesteten Probenmaterialien, welche mittels der bisher verfügbaren real-time PCR-Verfahren sowie Positivkontrollen durchgeführt wurden, bestätigten dies.

Da nach der EU-Verordnung 1829/2003 für gentechnisch veränderte Lebens- und Futtermittel für nicht zugelassene GVP kein Toleranzwert festgelegt ist, dürfen selbst sehr geringe Anteile nicht nachweisbar sein.

Bei der Untersuchung einzelner, kontaminierter Reischargen zeigte sich, dass die zur Analyse eingesetzte Probenmenge entscheidenden Einfluss haben kann, ob ein positives oder negatives Resultat erhalten wird [WAIBLINGER, 2007]. In dieser Veröffentlichung wurde exemplarisch anhand zweier repräsentativ erhobenen Sammelproben von Langkornreis gezeigt, dass besonders bei sehr niedrigem Verunreinigungsgrad im Bereich von ca. 0,005% teilweise negative Resultate erhalten werden, wenn die Größe der Laborprobe lediglich 6000 Partikel beträgt (Abb. 1).

Kontaminationen durch LL601-Reis- Einfluss der Laborproben-/Teilprobengröße

Probenmenge, die zur Untersuchung eingesetzt wurde	Sammelprobe A (ca. 10 kg; „LL601-positiv, <0,05%“)	Sammelprobe B (ca. 10 kg; „LL601-positiv, im Be- reich der NG, ca. 0,005%“)
1000 g	5 Teilproben à 1000 g LL601-positiv: 5 (15 von 15 Präp.)	2 Teilproben à 1000 g LL601-positiv: 1 (3 von 3 Präp.), LL601-positiv: 1 (2 von 3 Präp.)
400 g	5 Teilproben à 400 g LL601-positiv: 5 (15 von 15 Präp.)	2 Teilproben à 400 g LL601-positiv: 1 (3 von 3 Präp.), LL601-negativ: 1 (3 von 3 Präp.)
240 g	Nicht bestimmt	4 Teilproben à 240 g LL601-positiv: 4 von 4 Präp.
120 g = ca. 6000 Partikel	5 x 3 Teilproben à 120g LL601-positiv: 5 (15 von 15 Präp.) LL601-positiv #1: 3 von 3 Präp. LL601-positiv #2: 3 von 3 Präp. LL601-positiv #3: 3 von 3 Präp. LL601-positiv #4: 3 von 3 Präp. LL601-positiv #5: 3 von 3 Präp.	3 x 3 Teilproben à 120 g LL601-positiv: 3 (4 von 9 Präp.) LL601-positiv #1: 2 von 3 Präp. LL601-positiv #2: 1 von 3 Präp. LL601-positiv #3: 1 von 3 Präp.

Aus: Waiblinger HU, Hess N (2007) J Verbr. Lebensm 2: 4-6.

Abbildung 1

Eine Laborprobengröße von 6.000 Partikeln wurden beispielweise im Rahmen der Qualitätskontroll-Untersuchungen in den USA eingesetzt. Bereits bei homogener Verteilung der Verunreinigung reichen derartige Partikelzahlen für einen Nachweis geringer Verunreinigungen deutlich unter 0,1 % nicht aus (Tabelle 1)

Tabelle 1: Laborprobengröße und nachweisbare Verunreinigungen durch gv-Partikel [SeedCalc 7.1]

Partikelzahl der nachweisbare Verunreinigungen (p=95%)	
Laborprobe	
10.000	0,03 %
6.000	0,05 %
3.000	0,10 %

Nachdem auch bei Einfuhrkontrollen widersprüchliche Resultate erhalten wurden, sah sich die EU-Kommission veranlasst, eine detaillierte Empfehlung zur Beprobung von Langkornreis für die Untersuchung auf nicht zugelassenen Reis zu veröffentlichen [KOMMISSIONSENTSCHEIDUNG 2006/757]. Ähnlich wie bei der Untersuchung von Saatgut wird eine separate Untersuchung mehrerer Teilproben der ursprünglich eingesendeten Laborprobe empfohlen. Die maximale Partikelzahl der Teilprobe richtet sich nach der Nachweisgrenze des real-time PCR Verfahrens und beträgt im konkreten Fall ca. 10.000-12.000 (ca. 0,01 % gv-Reis = 1 Korn von 10000 war noch sicher detektierbar). Da nach der Kommissionsempfehlung die gesamte Probe bereits dann als positiv zu bewerten ist, wenn lediglich eine der insgesamt vier separat zu untersuchenden Teilproben ein positives Resultat liefert, liegt die Sensitivität dieses Verfahrens deutlich unter 0,01 % (ca. 0,006%, $p=95\%$).

Probenahmeschema für nicht zugelassene GVP

Ausgehend von dieser Verfahrensweise im speziellen Fall hat die o.g. Arbeitsgruppe des ALS ein allgemeines Probenahmeschema für die Untersuchung auf nicht zugelassene gv Soja, Mais, Reis oder Raps erarbeitet. Es soll nur für den Fall eingesetzt werden, dass besondere Verdachtsmomente auf Kontamination durch nicht zugelassene GVO im sehr geringen Spurenbereich vorliegen. Die Laborprobe sollte jeweils aus mindestens 50.000 Partikeln bestehen, davon sind 4 Teilproben à 10.000 Partikel jeweils separat zu untersuchen und wie in der Kommissionsentscheidung 2006/757 für Reis beschrieben zu bewerten.

Wie das Schema für zugelassene GVP [ALS-AG, 2007] soll das Verfahren insbesondere zur Beprobung unverpackter pflanzlicher Rohprodukte bei Importeuren und Herstellern, Verarbeitern etc. eingesetzt werden; allerdings ist auch die Vorgehensweise zur Beprobung verpackter Ware, etwa bei Abpackern oder Großverbrauchern (Gastronomie) beschrieben.

Aufgrund der je nach Korngewicht sich ergebenden großen Probenmengen ist das Verfahren relativ aufwändig. Es wurde bei der Erarbeitung der Versuch unternommen, dass die Probenmengen (Sammelprobe und Laborprobe) noch handhabbar sind (max. Sammelprobengröße 50 kg).

In den Abbildungen 2 und 3 sind - beispielhaft für Mais als (wegen seines relativ hohen Korngewichts) derzeitigen „worst case“ - die zu erhebenden Einzelprobenzahlen und -größen sowie Größe von Sammel-, Labor- und Analysenprobe dargestellt.

Probenahmeschema nicht zugelassene GVP – Big Bags und Säcke und verpackte Ware in Umkartons, Beispiel Mais



Angebotsform des Erzeugnisses	Zahl der Einheiten pro Partie (=P)	Zahl der zu beprobenden Einheiten (= N)	Zahl der Einzelproben	Menge einer Einzelprobe (=E)	Menge der Sammelprobe (=S)	Menge der Laborprobe und der amtlichen Gegenprobe	Jeweilige Menge der vier Analysenproben (=A) in Gramm (K = Korngewicht, in Milligramm)
gesackt/ Verbraucherpackungen in Umkartons*	P = 1 bis 10	N = P	N x 1	E=S/N	mind. 40 kg	20 kg	A = 10 x K = 2 bis 4,5 kg
	P = 10 – 100	10	10 x 1	4 kg			
Big Bags	P > 100	N = Wurzel P	N x 1	4 kg	mind. 40 kg	20 kg	A = 10 x K = 2 bis 4,5 kg
	P = 1 bis 10	N = P	N x 3 (jedoch mind. 12)	4 kg			
	P = 10 – 100	10	10 x 3	1,4 kg			
	P > 100	N = Wurzel P	N x 3	1,4 kg			

Abbildung 2

Probenahmeschema nicht zugelassene GVP – lose Ware – Beispiel Mais

Partiegröße (t)	Anzahl der Probenahmepunkte = Zahl der Einzelproben	Menge einer Einzelprobe (=E)	Menge der Sammelprobe (=S)	Menge der Laborprobe und der Gegenprobe	Jeweilige Menge der vier Analysenproben (=A) in Gramm (K = Korngewicht, in Milligramm)
Unter 50 t	10	4 kg	40 kg	20 kg	A = 10 x K = 2 bis 4,5 kg
50 bis 500 t	2 x Menge der Sammelprobe in kg	1 kg	0,01% der Partiegröße, mindestens 40 kg		
über 500 t	100	0,5 kg	50 kg		



Abbildung 3

Fazit

Aus den beispielhaften Vorgaben ist besonders für Mais erkennbar, dass hier die Grenze des sowohl im Labor als auch bei der Probenahme Machbaren erreicht ist, für Reis, Raps und auch für Soja sind die Vorgaben eher zu handhaben.

Die Anwendung des Probenahmeschemas sollte daher auf die bereits genannten Ausnahmefälle beschränkt bleiben, d.h. einer Beprobung bei Importeuren sowie weiteren „Flaschenhälsen“, wie Großverteilern des Lebensmittelhandels oder Erst-Verarbeitern von Soja, Reis, Raps und Mais.

Literatur:

ALS-AG, 2007: ALS-AG “Überwachung gentechnisch veränderter Lebensmittel” (2007): Probenahmeschema Gentechnik - zugelassene GVO.

http://www.bvl.bund.de/cln_027/DE/06__Gentechnik/00__doks__downloads/Probenahmeschema,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Probenahmeschema.pdf

KOMMISSIONSEMPFEHLUNG 2004/787: Empfehlung der Kommission 2004/787/EG vom 04.10.2004 für eine technische Anleitung für Probenahme und Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen und von aus gentechnisch veränderten Organismen hergestelltem Material als Produkte oder in Produkten im Kontext der Verordnung (EG) Nr. 1830/2003. Amtsblatt der Europäischen Union L 348/18 vom 24.11.2004.

KOMMISSIONSENTSCHEIDUNG 2006/757: Entscheidung der Kommission Nr. 2006/754/EG vom 06.11.2006 zur Änderung der Entscheidung 2006/601/EG über Dringlichkeitsmaßnahmen hinsichtlich des nicht zugelassenen gentechnisch veränderten Organismus „LL REIS 601“ in Reiserzeugnissen. Amtsblatt der Europäischen Union L 306/17 vom 07.11.2006.

PRCEN/TS 15568: Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten – Probenahmestrategien (TS 15568:2006)

SEEDCALC 7.1: USDA-GIPSA: <http://www.seedtest.org/upload/cms/user/SeedCalc7.1.xls>

WAIBLINGER, 2007: Waiblinger HU, Hess N (2007) Aktuelle Fragen beim Nachweis von nicht zugelassenem gentechnisch verändertem Reis. J Verbr. Lebens. 2: 4-6.

Probenahme zur Überwachung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) in Futtermitteln

Brigitte Roth

**Landwirtschaftliches Technologie Zentrum Augustenberg
76227 Karlsruhe**

Einführung

Der Handel und Transport von Agrarmassenware birgt die Möglichkeit der Verschleppung von GVO's in konventionelle Ware. Diese Verschleppungen werden in der Regel nicht gleichmäßig in einer Partie verteilt, sondern eher in einzelnen Nestern zu finden sein. Dies war bereits 1996 und 1998 bei Aktionen der Umweltschutzorganisation Greenpeace zu Tage getreten. Der Probenahme kommt daher eine entscheidenden Rolle für repräsentative Analysen zu.

Empfehlung 2004/787/EG der Kommission zu einer technischen Anleitung für Probenahme und Nachweis

Im Auftrag von ENGL (European Network of GMO Laboratories) wurden systematische Erhebungen an großen Partien (von 2791 t bis 63496 t) im Rahmen des KeLDA Projektes (**K**ernel **L**ot **D**istribution **A**ssesment) durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war das Abschätzen der Verteilung und des Verteilungsmusters sowie das Maß der Heterogenität zu bestimmen [1]. Aus den Ergebnissen dieser Studie wurde die Empfehlung 2004/787/EG der Kommission zu einer technischen Anleitung für Probenahme und Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen und von aus gentechnisch veränderten Organismen hergestelltem Material als Produkte oder in Produkten im Kontext der Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 abgeleitet. Diese Empfehlung verweist auf die ISO-Norm 542 für die Probenahme bei Ölsaaten und auf die ISO-Norm 2859 für verpackte Erzeugnisse.

In dieser Empfehlung wird für Agrarmassengüter eine Probenahme im Archiveinzelprobenverfahren vorgesehen. In Abhängigkeit von der Partiegröße werden 10 bis maximal 100 Einzelproben gezogen (Tab. 1).

Tab. 1: Umfang der Sammelproben und Anzahl der Einzelproben in Abhängigkeit von der Partiegröße nach EU Empfehlung 2004/787/EG

Größe der Partie [t]	Umfang der Sammelproben [kg]	Anzahl der Einzelproben
> 50	5	10
100	10	20
250	25	50
≥ 500	50	100

Das Archiv-Einzelprobenverfahren ist im Vergleich zum Sammelprobenverfahren mit einem wesentlich höheren Aufwand (Zeit- und Materialaufwand sowie Lagerkapazität für die Archiv-Einzelproben) verbunden. Bei großen zu beprobenden Partien kann die Sammelprobe einen Umfang erreichen, der mit den herkömmlichen Geräten hinsichtlich Homogenisierung und Teilung der Sammelprobe (z. B. Größe der Probenahmegeräte, Gerät zur Homogenisierung der Sammelprobe, Fassungsvermögen Probenteiler) nicht mehr zu bewältigen ist. Jede Einzelprobe wird geteilt, eine Hälfte wird einzeln archiviert, die jeweils zweiten Hälften werden als Sammelprobe vereinigt (Abbildung 1). Aus der Sammelprobe wird eine Analysenprobe erstellt und auf Vorhandensein von GVO untersucht. Ergibt die Analyse einen Wert nahe am Schwellenwert kann eine Untersuchung von mindestens 20 bis zu allen 100 Archiv Einzelproben erforderlich werden. Liegen weniger als 20 Archiv-Einzelproben vor, sollten sämtliche Proben einzeln analysiert werden.

Probenahme und Aufteilung der Proben bei Agrarmassengütern nach EU-Empfehlung 2004/787/EG

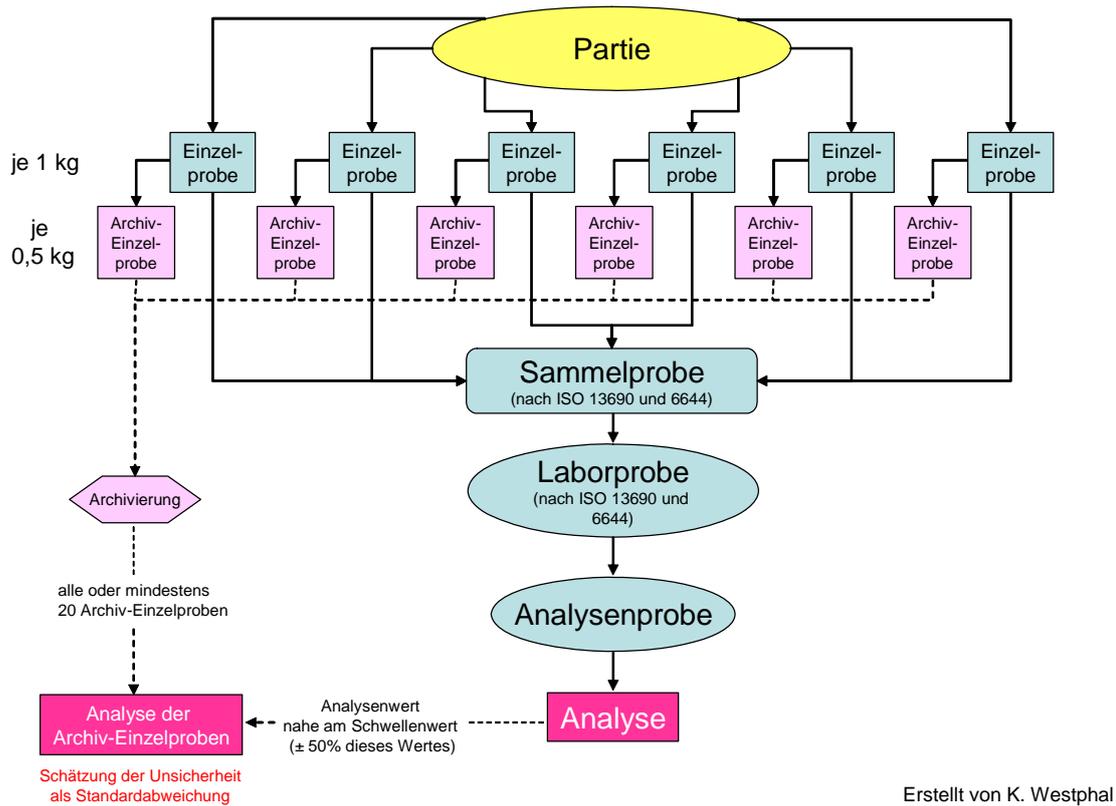


Abb. 1: Probenahme bei Agrarmassengütern nach EU Empfehlung 2004/787/EG

Futtermittel-Probenahme- und Analyseverordnung (FPA)

Nach derzeitiger Rechtslage (§ 1 FPA) können amtliche Futtermittelproben nur nach der Futtermittel-Probenahme- und Analyseverordnung (FPA) genommen werden. Umgekehrt können Proben, die nicht entsprechend der Vorgaben der FPA genommen wurden, nicht für die amtliche Futtermittelkontrolle herangezogen werden. Die Probenahme für Futtermittel zur Untersuchung auf Bestandteile von GVO erfolgt derzeit nach der FPA unter Berücksichtigung des GVO Orientierungsrahmens zur Überwachung des Herstellens, Behandelns, Verwendens und Inverkehrbringens von Futtermitteln im Zusammenhang mit gentechnisch veränderten Organismen.

Die in der FPA vorgesehenen Probenmengen reichen für eine repräsentative quantitative GVO Analytik von Ganzkornmaterial nicht aus. Eine Vorgehensweise nach der EU Empfehlung ist für die von den Bundesländern zu überwachenden Futtermittelpartien nicht angemessen. Es werden Ausgangs-, Zwischen- und Endprodukte bei Erzeugern, Großhändlern, Importeuren und Landwirten aus Silos und Schüttboxen, von LKW's und

vereinzelt auch Binnenschiffen beprobt. Die Partiegrößen bewegen sich zwischen einigen hundert Kilogramm bis hin zu Binnenschiffsladungen von 300-500 Tonnen. In Tabelle 2 sind zur Verdeutlichung die in Baden Württemberg im ersten Halbjahr 2007 auf GVO untersuchten Partien nach Art der Proben (verarbeitet/unverarbeitet) und Partiegröße aufgeschlüsselt.

Tab. 2: Beprobte Partien in Baden Württemberg im ersten Halbjahr 2007

Partiegröße	Mehl	Pellets	Flocken	Körner
bis 1 t	13	3	6	7
1 t bis 2,5t	5	1	0	2
2,5 t bis 10 t	5	1	0	4
10t bis 40t	5	2	0	12
Über 40 t	0	0	0	9

Das Archiv Einzelprobenverfahren bedingt einerseits einen großen Arbeitsaufwand für die Teilung sowie großen logistischen Aufwand für Kennzeichnung und Lagerung der Einzelproben und der Verwaltung des Ganzen. Andererseits ist die Zahl der zu entnehmenden Einzelproben bei Partiegrößen unter 100 t unseres Erachtens für eine repräsentative Aussage zu gering. Die von der amtlichen Futtermittelüberwachung zu beprobenden Partien bewegen sich in der Regel deutlich unter 50 t (Lkw-Ladungen), Partien von 300-500 t Größe (Schiffsladungen) sind die Ausnahme. Partiegrößen, wie die in der KELDA Studie untersuchten, spielen hier keine Rolle.

Daher hat der Arbeitskreis PCR-Analytik der Fachgruppe VI des VDLUFA ein Probenahmeschema für die Probenahme von Futtermitteln zur Untersuchung auf gentechnisch veränderte Bestandteile auf Basis der FPA erarbeitet.

Dieser im AK PCR-Analytik bereits abgestimmte Entwurf (siehe Anhang) mit dem Titel „Probenahme von Futtermitteln zur Untersuchung auf Bestandteile von in der EU zugelassenen GVO im Rahmen einer Überprüfung der Kennzeichnungspflicht“ wird im folgenden vorgestellt.

Entwurf des AK PCR-Analytik der Fachgruppe VI des VDLUFA

Wie oben erläutert ist das Vorgehen nach dem in der FPA beschriebenen Sammelverfahren grundsätzlich möglich. Für einige Einzelfutter müssen die Mindestzahlen der Einzelproben, Sammelproben und die Mindestmenge der Endproben jedoch angepasst werden.

Bereits im Arbeitspapier des Arbeitskreises PCR Analytik der Fachgruppe Futtermittel des VDLUFA „Konzept zur Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln“ wurde die Empfehlung ausgesprochen, möglichst unverarbeitete pflanzliche Rohstoffe zur analytischen Prüfung von Futtermitteln auf GVO heranzuziehen. Zur Überwachung von Mischfuttermitteln sollte die Untersuchung der jeweiligen Einzelfuttermittel bevorzugt werden [2].

Jede Laborprobe für die Untersuchung auf gentechnisch veränderte Bestandteile sollte eine Größe von mindestens 10.000 Körner bzw. Partikel haben [3]. Die Entnahme der Einzelproben sollte bei unverpackter Ware, sofern möglich aus bewegtem Material erfolgen (z. B. Be- und Entladung). Problematisch ist die Probenahme beim Abkippen von Lkw-Ladungen in unterirdische Silos. Hier spielt der Zeitfaktor eine nicht zu unterschätzende Rolle. Der Abkippvorgang erfolgt relativ schnell und wird nicht unterbrochen.

Ist eine Probenahme bei bewegten Materialien nicht möglich, sind die Einzelproben gleichmäßig verteilt über die Lkw-Ladung/Schiffsluke oder Container zu entnehmen. Nach § 7 der FPA müssen aus jeder Sammelprobe drei Endproben gebildet werden, die Größe der Sammelproben muss dementsprechend angepasst werden.

Verarbeitete Futtermittel

Bei verarbeiteten Futtermitteln, die während der Verarbeitung einen Zerkleinerungsprozess, wie z. B. Mehlmüllerei und Schrotten, durchlaufen haben, kann die Probenahme in der Regel nach der in der Futtermittelprobenahme- und -Analysen-Verordnung (FPA) für verpackte und unverpackte Ware beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt werden (siehe Anhang Tabellen A und B). Um eine einheitliche Vorgehensweise zu gewährleisten, wurden die Einzelfuttermittel der Positivliste [4], die nach diesen Vorgaben beprobt werden können, zusammengefasst (Tabelle 3 bzw. Anhang Tabelle 1). In dieser Tabelle sind entsprechend verarbeitete Einzelfuttermittel und Futtermittelausgangserzeugnisse derjenigen Fruchtarten genannt, für die derzeit (Oktober 2007) GV-Linien

(Gentechnisch Verändert) bekannt sind (Mais, Reis, Raps, Soja, Kartoffel, Zuckerrübe sowie Baumwolle).

Tab. 3: Einzelfuttermittel (Futtermittelausgangserzeugnisse) die nach § 5 der FPA (Anhang Tabellen A und B) beprobt werden können

Positivliste Nr.	Bezeichnung
1.05.02 bis 1.05.17	Maisprodukte
1.06.02 bis 1.06.07, 1.06.09, 1.06.10, 1.06.15	Reisprodukte
2.11.02 bis 2.11.05	Rapsprodukte
2.14.03 bis 2.14.08	Sojaprodukte
4.03.02 bis 4.03.07	Kartoffelprodukte
4.10.02 bis 4.10.10	Zuckerrübenprodukte

Verpackte Futtermittel werden in Abhängigkeit von der Verpackungsgröße und -anzahl nach Tabelle A (Anhang) gezogen, die Mindestmenge der Sammelprobe beträgt 4 kg, die der Endprobe 500 g.

Bei unverpackten Futtermitteln bis zu einer Partiegröße von 2,5 t werden mindestens sieben Einzelproben entnommen, die zu einer Sammelprobe von 4 kg vereinigt werden. Die Sammelprobe wird in drei Endproben von mindestens 500 g geteilt. Für Partien größer 2,5 t wird die Anzahl der zu entnehmenden Einzelproben aus der Quadratwurzel des 20-fachen Gewichts der Partie in Tonnen, aufgerundet auf ganze Zahlen, berechnet. Die Mindestmengen für Sammel- und Endprobe sind wiederum 4 kg bzw. 500 g (Anhang Tabelle B).

Für die Praxis bedeutet dies beispielsweise bei der Beprobung einer Schiffsladung von 300 t Sojaschrot (Positivliste Nr. 2.14.05) während der Entladung bei einer Entladezeit von 8 Stunden ist alle 12 min eine Einzelproben von mindestens 100 g zu entnehmen, insgesamt 40 Einzelproben sind notwendig.

Ausgangsprodukte

Für Futtermittel mit großer Partikelgröße z. B. Ganzkornmaterial sowie für Silage reichen die in § 5 der FPA vorgesehenen Probenmengen für eine repräsentative GVO Analytik nicht aus. In diesem Fall sollte die Probenahme bei verpackter bzw. unverpackter Ware nach den Vorgaben erfolgen, die auf „der Kontrolle von Futtermitteln auf unerwünschte Stoffe und verbotene Stoffe, die ungleichmäßig verteilt sein können, basieren (siehe § 6 und § 7 der FPA). Für eine Laborprobe (Endprobe) aus mindestens 10.000 Partikeln müssen aufgrund der vorliegenden Partikelgrößen größere Probenmengen (Endproben von je 2-3 kg) gezogen werden. Es findet eine Stratifizierung statt, in Ab-

hängigkeit von der Partiegröße werden bis zu vier Sammelproben gezogen. Nach diesen Vorgaben der Tabellen C für verpackte und Tabelle D für unverpackte Futtermittel sind die in Tabelle 4 bzw. Tabelle 2 des Anhangs genannten Einzelfuttermittel zu beproben.

Tab. 4: Einzelfuttermittel (Futtermittelausgangserzeugnisse) die nach § 7 der FPA (Anhang Tabellen C und D) beprobt werden können

Positivliste Nr.	Bezeichnung
1.05.01, 7.06.01	Mais Körner, Pflanzenteile (frisch, siliert oder getrocknet)
1.06.01	Reis Körner
2.11.01	Raps Körner
2.14.01, 2.14.02	Soja Bohnen, unbehandelt und dampferhitzt
4.03.01	Kartoffeln Knollen
4.10.01	Zuckerrüben ganze Rüben, Blätter (frisch, siliert oder getrocknet)
2.01.01.	Baumwollsaat

Auch hier wird die Zahl der Einzelproben bei großen Partien nach dem Quadratwurzelverfahren berechnet, die Mindestmenge der Endprobe errechnet sich aus dem Tausendkorngewicht der Partikel, da drei Endproben benötigt werden, muss die Sammelprobe mindestens die dreifache Menge der Endprobe betragen. Der Mindestumfang der Einzelprobe wird aus der benötigten Menge der Sammelproben dividiert durch die Mindestzahl der Einzelproben ermittelt.

Bei der Beprobung einer Schiffsladung von 300 t Sojabohnen (Positivliste Nr. 2.14.01) sind 3 Sammelproben a 6000 g aus jeweils 78 Einzelproben zu entnehmen. Bei einer Entladezeit von 8 Stunden bedeutet dies, dass alle 2 min eine Einzelprobe entnommen wird.

Literatur

[1] Paoletti et al. 2006: Kernel lot distribution assesment (KeLDA: a study on the distribution of GMO in large soybean shipments. Eur. Food Res. Technol.

[2] Konzept zur Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln, Arbeitspapier des Arbeitskreises PCR-Analytik der Fachgruppe Futtermittel des VDLUFA, 2005

[3] P. Hübner, H.-U. Waiblinger, K. Pietsch und P. Brodmann: Validation of PCR Methods for Quantitation of Genetically Modified Plants in Food. Journal of AOAC International Vol. 84, No. 6, 2001, 1855 – 1864

[4] Zentralausschuss der Deutschen Landwirtschaft, Normenkommission für Einzelfuttermittel <http://www.dlg.org/de/landwirtschaft/futtermittelnet/positivliste/index.html>

Experimentelle Überwachung von gentechnischen Arbeiten: Entnahme von Proben und Analytik

Francisco Moreano

**Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
85764 Oberschleißheim**

Gentechnische Arbeiten reichen im Sinne des Gentechnikgesetzes weit über die Erzeugung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) hinaus. Zu den gentechnischen Arbeiten zählen auch die Vermehrung und Verwendung von GVO sowie ihre Lagerung, Zerstörung, Entsorgung und der innerbetriebliche Transport. Die Durchführung von gentechnischen Arbeiten setzt die Verfügbarkeit von speziell konzipierten Einrichtungen (sog. gentechnische Anlagen) voraus. Diese Anlagen erlauben die Anwendung von spezifischen Einschließungsmaßnahmen, um den Kontakt der verwendeten GVO mit Menschen und der Umwelt zu begrenzen und ein dem Gefährdungspotenzial angemessenes Sicherheitsniveau zu gewährleisten. Die Vielfalt der gentechnischen Anlagen kann von Forschungs- und Untersuchungslaboratorien über Produktions- bzw. Fermentationsanlagen, bis hin zu Gewächshäusern oder Tierhaltungseinrichtungen reichen.

1. Rechtlicher Rahmen

Das deutsche Gentechnikgesetz (GenTG) stellt die Umsetzung der europäischen Richtlinien über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt (2001/18/EG) und über die Anwendung von gentechnisch veränderten Mikroorganismen in geschlossenen Systemen (98/81/EG) in nationales Recht dar. Somit regelt das Gentechnikgesetz jeglichen Umgang mit lebensfähigen gentechnisch veränderten Organismen (GVO) und deckt weite Bereiche der grünen, roten und weißen Gentechnik ab (s. Abb. 1). Vom Geltungsbereich des GenTG ausgenommen ist die direkte Anwendung von GVO am Menschen (Gentherapie).

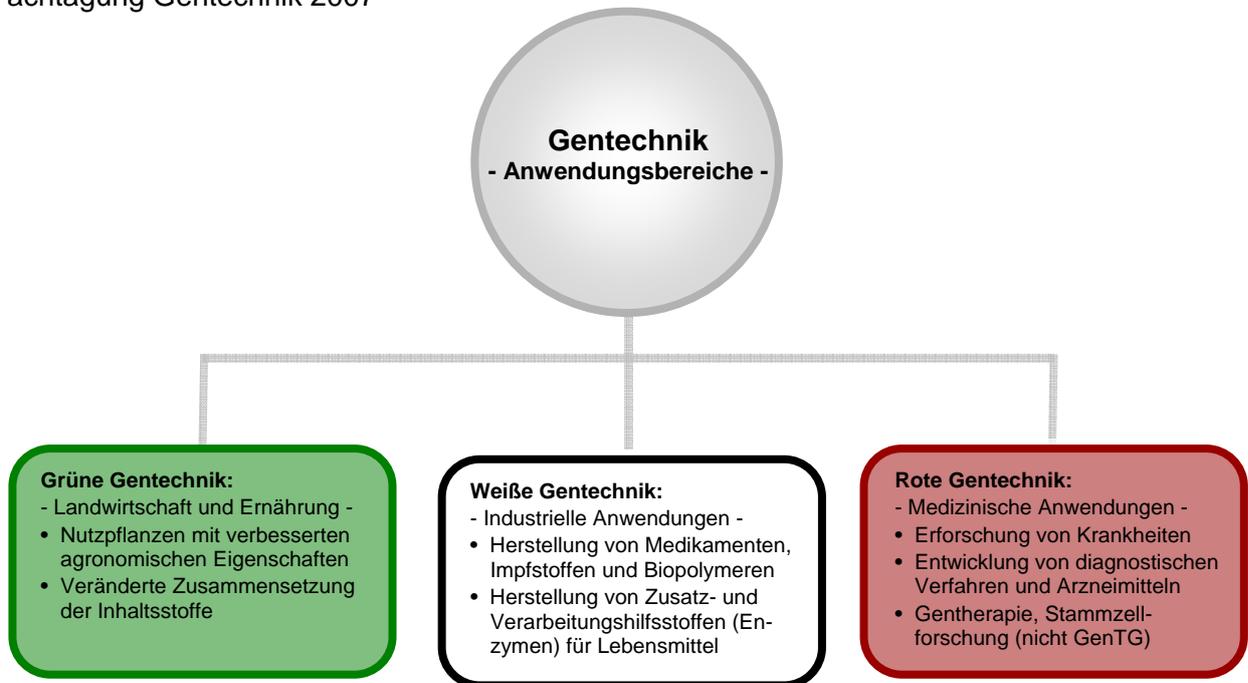


Abbildung 1. Anwendungsbereiche der Gentechnik. Die grüne Gentechnik beschäftigt sich mit dem Einsatz gentechnisch veränderter Organismen in der Landwirtschaft und Ernährung. Dieser Anwendungsbereich zielt auf die Freisetzung und das Inverkehrbringen von GVO ab. Kulturpflanzen mit verbesserten agronomischen Eigenschaften bzw. mit veränderten Zusammensetzungen der Inhaltsstoffe, zur Sicherung der landwirtschaftlichen Produktion, Verbesserung der ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Lebensmitteln oder zur Gewinnung von regenerativen Rohstoffen stellen aktuelle Beispiele dar. Der Bereich der weißen Gentechnik beschäftigt sich mit der industriellen Herstellung von Stoffwechselprodukten (z.B. Enzymen, Medikamenten, Impfstoffen, Biopolymeren, Chemikalien, etc.) in geschlossenen Anlagen. Sie ermöglicht die Gestaltung von energetisch günstigen und umweltfreundlichen Produktionsverfahren. Die rote Gentechnik erfasst medizinische Fragestellungen. Sie studiert die Grundlagen genetisch bedingter Krankheiten und sucht nach Möglichkeiten solche Krankheiten nicht nur symptomatisch sondern kausal zu therapieren. Anwendungen wie die Gentherapie an Menschen bzw. die Stammzellforschung werden nicht im Rahmen des Gentechnikgesetzes (GenTG) behandelt.

Der rechtliche Rahmen für die Durchführung von gentechnischen Arbeiten in gentechnischen Anlagen wird vom Gentechnikgesetz und eine Serie von begleitenden Verordnungen vorgegeben (s. Tabelle 1). Dieser Rahmen legt das Verfahren für die Genehmigung gentechnischer Anlagen und Arbeiten fest, er definiert die für die Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten relevanten Parameter und verweist auf entsprechende Sicherheitsmaßnahmen auf baulicher, technischer, organisatorischer und experimenteller Ebene. Das Gentechnikgesetz liefert darüber hinaus die rechtliche Basis für die Überwachung gentechnischer Arbeiten in geschlossenen Systemen.

Tabelle 1. Rechtlicher Rahmen für die Durchführung von gentechnischen Arbeiten in gentechnischen Anlagen. Diese Tabelle dient als Übersicht und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die Regelungen sind in der kostenlos benutzbaren Internet-Gesetzessammlung des Bundesministeriums der Justiz. Das EU-Recht ist über das Internetportal EurLex zugänglich.

Gesetz / Verordnung	Wesentliche Inhalte
Gentechnikgesetz (GenTG)	<ul style="list-style-type: none"> • Grundlage des deutschen Gentechnikrechts • Ziele: Schutz vor möglichen Gefahren der Gentechnik, Schaffung eines rechtlichen Rahmens für die Nutzung der Gentechnik. • Arbeiten in gentechnischen Anlagen: <ul style="list-style-type: none"> - Definition von Sicherheitsstufen, Sicherheitsmaßnahmen - Genehmigung von gentechnischen Anlagen bzw. Arbeiten • Freisetzung und Inverkehrbringen: <ul style="list-style-type: none"> - Zulassungsantrag, Genehmigung - Standortregister, Beobachtung • Aufzeichnungs-, Überwachungspflichten • Haftung, Straf- und Busgeldvorschriften
Gentechnik-SicherheitsVO (GenTSV)	<ul style="list-style-type: none"> • Grundlagen der Sicherheitseinstufung • Organisatorische Sicherheitsmaßnahmen: <ul style="list-style-type: none"> - Unterrichtung von Beschäftigten - Arbeitsmedizinische Vorsorge - Projektleiter, Beauftragter für biologische Sicherheit • Bauliche / technische Sicherheitsmaßnahmen: <ul style="list-style-type: none"> - Labor und Produktionsbereich - Gewächshäuser - Tierhaltungsräume • Biologische Sicherheitsmaßnahmen: <ul style="list-style-type: none"> - Anerkannte Vektoren-Empfängersysteme - Verhinderung der Ausbreitung von gentechnisch veränderten Mikroorganismen, Pflanzen, Tieren
Gentechnik-VerfahrensVO (GenTVfV)	<ul style="list-style-type: none"> • Antrags- und Anmeldeunterlagen für gentechnische Arbeiten in gentechnischen Anlagen, Freisetzungen und Inverkehrbringen • Genehmigungs- und Anmeldeverfahren
Gentechnik-AufzeichnungsVO (GenTAufzV)	<ul style="list-style-type: none"> • Aufzeichnungspflicht bei gentechnischen Arbeiten, Freisetzungen • Umfang der Aufzeichnungen und Aufbewahrungsdauer
Gentechnik-NotfallVO (GenTNotfV)	<ul style="list-style-type: none"> • Erstellung von außerbetrieblichen Notfallplänen • Informations-, Melde- und Unterrichtungspflichten
Gentechnik-BeteiligungsVO (GenTBetV)	<ul style="list-style-type: none"> • Bei Verfahren zur Genehmigung von Freisetzungen und Inverkehrbringen • Beteiligung des Rates, der Kommission und der Behörden der Mitgliedstaaten der Europäischen Union sowie anderer Vertragsstaaten des Abkommens über den Europäischen Wirtschaftsraum
Gentechnik-AnhörungsVO (GenTAnhV)	<ul style="list-style-type: none"> • Anhörungen im Vorfeld zur Genehmigung von: <ul style="list-style-type: none"> - Errichtung und Betrieb einer gentechnischen Anlage - Freisetzung von Organismen • Bekanntmachung des gentechnischen Vorhabens
ZKBS-Verordnung (ZKBSV)	<ul style="list-style-type: none"> • Zentrale Kommission für die biologische Sicherheit (ZKBS). • Aufgaben und Zusammensetzung der ZKBS
Bayerische Gentechnik-ZuständigkeitsVO (ZustVGenT)	<ul style="list-style-type: none"> • Zuständigkeit für den Vollzug liegt bei den Regierungen • Die Regierungen und die Gewerbeaufsicht sind zuständig für die technische Überwachung • LGL: Zuständig für die Entnahme und Untersuchung von Proben

2. Gentechnische Arbeiten

Gentechnische Arbeiten reichen weit über die Erzeugung von GVO hinaus. Zu den gentechnischen Arbeiten zählen auch die Verwendung von GVO sowie ihre Vermehrung, Lagerung, Zerstörung, Entsorgung sowie der innerbetriebliche Transport. Abbildung 2 zeigt ein Beispiel für die Durchführung einer gentechnischen Arbeit: die Übertragung von Erbinformation eines Spenderorganismus in einen Empfängerorganismus.

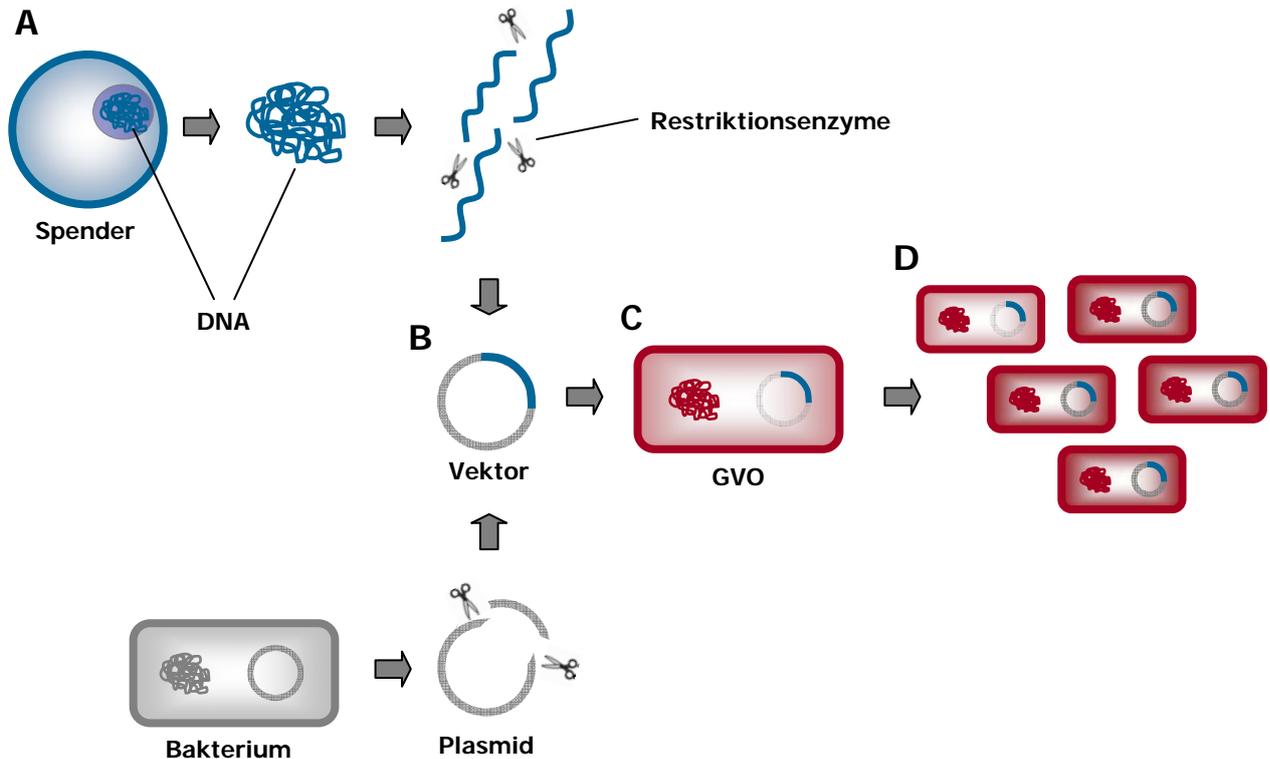


Abbildung 2. Beispiel einer gentechnischen Arbeit: Übertragung von Erbinformation (Genen) eines Spenderorganismus (blau) in einen Empfängerorganismus (rot). Die DNA eines Spenderorganismus wird isoliert und mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaut (A). Vektoren (z.B. die Plasmide eines Bakteriums) dienen als Vehikel für den Gentransfer (B). Ein gentechnisch veränderter Organismus (GVO) entsteht nach dem erfolgreichen Einschleusen eines Vektors in einen Empfängerorganismus (C). Der mit den neuen Eigenschaften ausgestattete GVO wird vermehrt und kann beispielsweise für die Anreicherung und Gewinnung von Stoffwechselprodukten (z.B. Proteinen bzw. Enzymen, Medikamenten, Impfstoffen, Biopolymeren, Chemikalien, etc.) eingesetzt werden (D).

Rechtliche Abgrenzung gentechnischer Arbeiten

Tabelle 2 liefert eine Gegenüberstellung von Tätigkeiten, die in den Geltungsbereich des GenTG fallen und solchen, die vom Geltungsbereich des GenTG ausgenommen sind.

Tabelle 2. Rechtliche Abgrenzung gentechnischer Arbeiten anhand ausgewählter Beispiele. Diese Tabelle dient als Übersicht und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Tätigkeitsbereich	Im Geltungsbereich des GenTG	Nicht im Geltungsbereich des GenTG	Weitere Informationen
Umgang mit Nukleinsäuren	Übertragung von gentechnisch veränderten Plasmiden in Organismen, Vermehrung von Gensonden in Bakterien	Injektion von mRNA in Zellen, soweit dabei keine rekombinanten Viren entstehen, PCR, Arbeiten mit rekombinanter DNA (z.B. Plasmiden), soweit sie nicht in Organismen übertragen werden	Allgemeine Stellungnahmen der ZKBS
Biotechnologische Produktion	Einsatz von GVO in Fermentationsprozessen	Aufarbeitung von Enzymen, nach vollständiger Abtötung bzw. Entfernung von GVO	
Umgang mit GVO	Autoklavieren (Vernichtung) von GVO, Lagerung von GVO, Innerbetrieblicher Transport von GVO, Haltung von transgenen Tieren	Außerbetrieblicher Transport von GVO	Informationen der BAuA zum außerbetrieblichen Transport von GVO
Gentherapie	Vorbereitende Arbeiten zur Anwendung der Gentherapie, bei denen GVO verwendet werden	Direkte Anwendung der Gentherapie am Menschen	Arzneimittelgesetz, GCP-Verordnung
Selbstklonierung	Selbstklonierungen, bei denen gentechnisch veränderte Organismen als Spender oder Empfänger eingesetzt werden	Selbstklonierungsexperimente mit natürlich vorkommenden Organismen	Allgemeine Stellungnahmen der ZKBS
Verfahren der genetischen Veränderung	Einsatz von Techniken zur DNA-Rekombination mit nachfolgender Übertragung auf Empfängerorganismen	Herstellung von Mutanten mit Hilfe mutagener Substanzen (§ 3 GenTG), Erzeugung von somatischen menschlichen oder tierischen (gentechnisch unveränderten) Hybridoma-Zellen	

Der außerbetriebliche Transport fällt nicht in den Regelungsbereich des GenTG. Hierfür gelten die Vorschriften zum Gefahrguttransport. Die Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) hat auf ihren Internetseiten eine Übersicht über die gefahrgutrechtlichen Bestimmungen für den Transport von ansteckungsgefährlichen Stoffen veröffentlicht. In diesem Kontext wird auch der Transport von gentechnisch veränderten Organismen behandelt.

Sicherheitsbewertung gentechnischer Arbeiten

Je nach ihrem Gefährdungspotenzial werden gentechnische Arbeiten den Sicherheitsstufen 1 bis 4 zugeordnet. Arbeiten, bei denen von keinem Risiko für die menschliche Gesundheit und für die Umwelt auszugehen ist, können in gentechnischen Anlagen mit Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 1 durchgeführt werden. Im Gegensatz dazu stellen Arbeiten der Sicherheitsstufe 4 ein hohes Risiko dar und erfordern die Einhaltung höchster Sicherheitsstandards.

Die Sicherheitseinstufung von gentechnischen Arbeiten erfolgt auf der Grundlage einer Gesamtbewertung von sicherheitsrelevanten Parameter (z.B. Eigenschaften der Spender- und Empfängerorganismen, der eingesetzten Vektoren sowie der erzeugten gentechnisch veränderten Organismen) und kann, wenn notwendig, unter Beteiligung der beim Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) eingerichteten Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) erfolgen. Allgemeine Kriterien sowohl für die Sicherheitsbewertung von gentechnischen Arbeiten als auch für die Konzeption von gentechnischen Anlagen mit definierten Sicherheitsmaßnahmen sind in der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) definiert.

3. Gentechnische Anlagen

Die Durchführung von gentechnischen Arbeiten setzt die Verfügbarkeit von speziell konzipierten Einrichtungen voraus, welche von der zuständigen Landesbehörde als Gentechnische Anlagen zugelassen werden müssen. Diese Anlagen erlauben die Anwendung von spezifischen Einschließungsmaßnahmen, um den Kontakt der verwendeten GVO mit Menschen und der Umwelt zu begrenzen und ein dem Gefährdungspotenzial angemessenes Sicherheitsniveau zu gewährleisten. Die Vielfalt der gentechnischen Anlagen kann von Forschungs- und Überwachungslaboratorien über Produktions- bzw. Fermentationsanlagen, bis hin zu Gewächshäusern oder Tierhaltungseinrichtungen rei-

chen. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die bundesweite Entwicklung von Zulassungen gentechnischer Anlagen im Vergleich zum Freistaat Bayern. Es wird ersichtlich, dass der allgemeine Wachstumstrend sich seit dem Jahr 2002 deutlich verlangsamt hat. Gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 4 werden in Deutschland derzeit nicht durchgeführt. Abbildung 4 zieht einen Vergleich zwischen den aktuellen Verteilungen der Sicherheitsstufen.

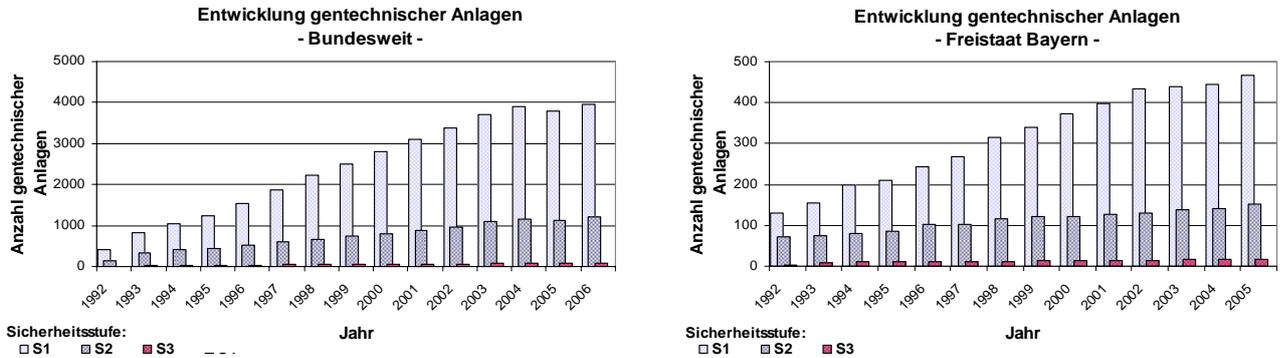


Abbildung 3. Überblick über die Entwicklung von Zulassungen gentechnischer Anlagen. Quellen: Bayerisches Staatsministerium für Umwelt Gesundheit und Verbraucherschutz; Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.

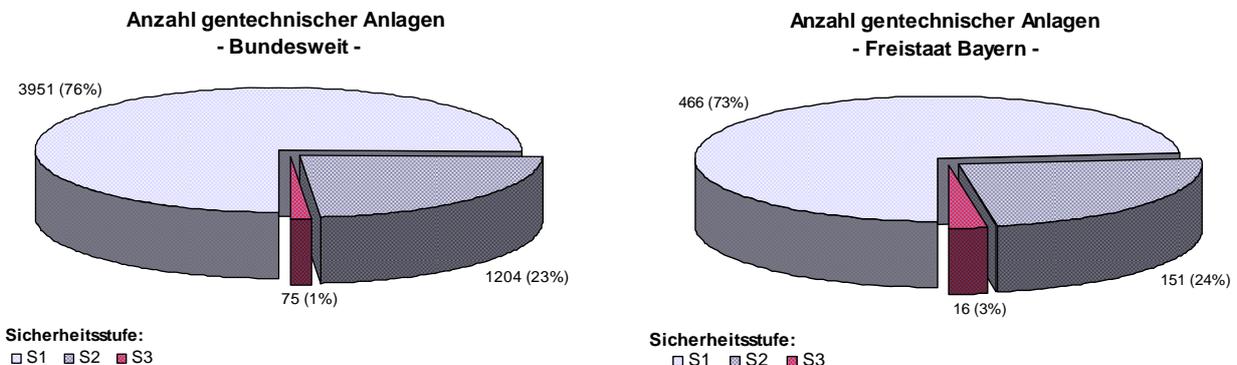


Abbildung 4. Verteilungen von gentechnischen Anlagen gegliedert nach Sicherheitsstufen (Stand: Dez. 2005). Quellen: Bayerisches Staatsministerium für Umwelt Gesundheit und Verbraucherschutz; Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.

4. Experimentelle Überwachung gentechnischer Arbeiten:

Entnahme von Proben und Analytik

In Deutschland sind die Länder für die Überwachung der Durchführung des Gentechnikgesetzes zuständig. Im Freistaat Bayern obliegt die Überwachung gentechnischer Arbeiten und Anlagen den Regierungen von Oberbayern (für die Regierungsbezirke Oberbayern, Niederbayern und Schwaben) und Unterfranken (für die Regierungsbezirke Oberfranken, Mittelfranken, Unterfranken und Oberpfalz). Die Überwachungsbehörde ist befugt, Betriebsräume zu besichtigen, Einsicht in Unterlagen zu fordern und Proben für die experimentelle Überwachung zu entnehmen.

Das Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit ist für die experimentelle Überwachung beim Vollzug des Gentechnikgesetzes zuständig. Zu den Aufgaben der experimentellen Überwachung zählen sowohl die Entnahme und Untersuchung von Proben aus gentechnischen Anlagen als auch die analytische Überprüfung von gentechnischen Arbeiten. Die Analyse von Proben aus gentechnischen Arbeiten in geschlossenen Systemen zielt auf die Überprüfung der Einhaltung von gentechnikrechtlichen Vorgaben unter Berücksichtigung der zugrunde liegenden Rahmenbedingungen für die Arbeit mit biologischen Arbeitsstoffen. Die Techniken der Probenahme müssen für einen bestmöglichen Erhalt der biologischen Aktivität der Mikroorganismen optimiert sein. Dies kann z.B. durch die Verwendung von speziellen Transportmedien und die Einhaltung optimaler Transportbedingungen erreicht werden. Die Analyse der Proben konzentriert sich auf den Nachweis von vermehrungsfähigen Organismen insbesondere unter Anwendung von kulturellen Verfahren. Ergebnisse aus molekularbiologischen Untersuchungen müssen fallweise ausgewertet werden, da der Nachweis von Nukleinsäuresequenzen nicht zwingend eine Kontamination mit vermehrungsfähigen Mikroorganismen beweist. Molekularbiologische Nachweisverfahren eignen sich insbesondere für die nähere Charakterisierung von GVO und rekombinanten Konstrukten. Gegenstand der mikrobiologischen und molekularbiologischen Analytik ist die Überprüfung folgender Schwerpunkte:

Sicherheit und Hygiene am Arbeitsplatz (primäres Containment)

Die in der Biostoffverordnung definierten Grundlagen für Arbeiten mit biologischen Arbeitsstoffen (einschließlich gentechnisch veränderten Mikroorganismen) bilden ebenfalls die Basis für die Durchführung von gentechnischen Arbeiten, es sei denn das Gentechnikrecht schreibt gleichwertige oder strengere Regelungen vor. Mängel bei der Einhaltung einer guten mikrobiologischen Praxis können z.B. durch den Nachweis mikrobieller Kontaminationen außerhalb der primären physikalischen Einschließung (z.B. mikrobiologische Sicherheitswerkbank) festgestellt werden. Dabei ist die mikrobielle Belastung der Luft (Aerosole) im biologischen Gefahrenbereich ebenfalls zu berücksichtigen. Für die Entnahme von Proben stehen in erster Linie Wisch- und Abstrichtechniken von Labor- bzw. Geräteoberflächen zur Verfügung. Die Überprüfung der mikrobiellen Belastung in der Luft kann unter Anwendung eines Systems zur Luftkeimsammlung durchgeführt werden.

Effektivität von Einschließungsmaßnahmen (sekundäres Containment)

Die sekundären Einschließungsmaßnahmen einer gentechnischen Anlage (d.h. die Grenzen des geschlossenen Systems) dienen der Vermeidung einer unbeabsichtigten Freisetzung von gentechnisch veränderten Organismen in die Umwelt. Mit der Überprüfung der Effektivität von sekundären Einschließungsmaßnahmen soll gewährleistet werden, dass kein unbeabsichtigtes Entweichen von gentechnisch veränderten Organismen in die Umwelt stattfindet. Die Analysen konzentrieren sich auf die Überprüfung der Wirksamkeit folgender Parameter:

- Prozesse zur Inaktivierung von Abfällen und Abwässern sowie Abluftfilterung
- Verfahren zur Inaktivierung bzw. Entfernung von GVO aus Erzeugnissen der biotechnologischen Produktion
- Maßnahmen zur Vermeidung von Verschleppungen in die Umwelt

Der Wirksamkeitsnachweis von Prozessen zur Behandlung von Abfällen, Abwässern und Abluft kann anhand von Proben der behandelten Medien erfolgen. Darüber hinaus können Festkörper- und gegebenenfalls auch Abwassersterilisatoren durch den Einsatz von biologischen Indikatoren getestet werden. Als Proben für die Überprüfung der GVO-Freiheit in Erzeugnissen der biotechnologischen Produktion kommen die Produkte

selbst in Frage. Verschleppungen von vermehrungsfähigen GVO in die Umwelt (außerhalb der gentechnischen Anlage) können anhand von Wisch- und Abstrichproben von Oberflächen als auch durch Umweltproben festgestellt werden.

Überprüfung der experimentellen Arbeit auf Konformität mit Genehmigungs- und Aufzeichnungsdokumenten

Die Überprüfung von gentechnischen Arbeiten auf Konformität mit Genehmigungs- und Aufzeichnungsdokumenten kann auf mikrobiologischer oder molekularer Ebene erfolgen. Die Analysen konzentrieren sich auf die Kontrolle der Identität und Reinheit von Spender- und Empfängerorganismen, Vektoren und GVO. Als Proben für die Analysen eignen sich die eingesetzten Kulturen selbst.

Der Nachweis der Identität der eingesetzten Organismen wird anhand von spezifischen Nachweisverfahren durchgeführt. Für die Überprüfung der Reinheit kommen dagegen Screeningverfahren zum Einsatz, die den Nachweis eines breiten Spektrums an Kontaminanten ermöglichen. Bakterielle Kulturen können zum Beispiel ohne Selektionsdruck ausplattiert werden, um sowohl phänotypische als auch eine genotypische (Sequenzierung von 16S rRNA-Genen) durchzuführen.

5. Weitere Tätigkeitsschwerpunkte des LGL

Entwicklung und Validierung von molekularbiologischen Nachweismethoden für die amtliche Überwachung im Unterausschuss Methodenentwicklung (UAM) der Bund/Länder Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)

Mitwirkung bei der Erstellung einer amtlichen Methodensammlung gemäß §28b GenTG, ständige Arbeitsgruppe des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Berlin

Mitarbeit bei Erstellung der VDI-Richtlinie 6300 zum sicheren Betrieb von gentechnischen Anlagen, Arbeitsgruppe des Vereins Deutscher Ingenieure (VDI), Düsseldorf

Codex Alimentarius Guidelines: Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO) im Spurenbereich

Marianna Schauzu

**Bundesinstitut für Risikobewertung
Thielallee 88-92, 14195 Berlin**

Einleitung

Gentechnisch veränderte Organismen (GVO), die zur Herstellung von Lebens- oder Futtermitteln bestimmt sind, dürfen in der *Europäischen Union* (EU) nur dann auf den Markt gebracht werden, wenn sie gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 zugelassen wurden (1). Eine Zulassung kann erteilt werden, wenn die *European Food Safety Authority* (EFSA) nach Prüfung der Antragsunterlagen festgestellt hat, dass die gentechnisch veränderten Produkte keine nachteiligen Auswirkungen auf die Gesundheit von Mensch und Tier oder die Umwelt haben.

Für Lebens- und Futtermittel, die Material aus in der EU nicht zugelassenen GVO enthalten, gilt die Nulltoleranz, d.h. sie sind in der EU nicht verkehrsfähig. Ein Schwellenwert von 0,5 Prozent galt während einer Übergangszeit für zufällige oder technisch nicht vermeidbare Spuren von Material aus GVO, die noch nicht zugelassen, für die aber bereits eine befürwortende Stellungnahme der EFSA vorlag und Nachweisverfahren öffentlich verfügbar waren. Diese Ausnahmeregelung ist am 18.04.2007 ausgelaufen. Seither gilt die Nulltoleranz auch für GVO, die sich im Antragsverfahren befinden und von der EFSA bereits positiv bewertet wurden.

Gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 wurden bisher Zulassungen für fünf transgene Maissorten und eine transgene Zuckerrübensorte erteilt (Stand: April 2008). Produkte aus weiteren acht transgenen Mais-, fünf Baumwoll-, drei Rapsorten und einer Sojabohnensorte, die bereits entweder gemäß der Verordnung (EG) Nr. 258/97 (Neuartige Lebensmittel-Verordnung) oder der Richtlinie 90/220/EG bzw. 2001/18/EG (Freisetzungsrichtlinie) als Lebens- oder Futtermittel verkehrsfähig waren, können weiterhin auf den Markt gebracht werden, weil sie bis zum 18. April 2004 bei der Europäischen Kommission notifiziert wurden. Für zwei transgene Mais- und drei transgene Rapsor-

ten, die nach altem Recht zugelassen, aber nach Auslaufen der Genehmigungen zum 18.04.2007 von den Antragstellern vom Markt genommen wurden, hat die Europäische Kommission entschieden, dass zufällige oder technisch unvermeidbare Spuren von Material aus diesen transgenen Pflanzen in Lebens- oder Futtermitteln bis zu einem Gehalt von 0,9 Prozent bis April 2012 toleriert werden (2).

Für acht Anträge auf Inverkehrbringen von transgenen Pflanzen (Mais, Sojabohnen, Reis, Raps, Baumwolle, Kartoffeln) liegen befürwortende Stellungnahmen der EFSA vor, 39 weitere Anträge liegen dem für die Bewertung gentechnisch veränderter Organismen zuständigen Gremium (*GMO Panel*) der EFSA zur Bearbeitung vor (Stand: April 2008) (3).

Allein in den USA wurden seit 1995 von der *Food and Drug Administration* (FDA) 71 transgene Pflanzensorten bewertet (darunter Mais, Raps, Baumwolle, Sojabohnen, Tomaten, Kartoffeln, Zuckerrüben, Squash, Reis, Papaya), die dort kommerziell angebaut werden können (bis auf Pestizid-exprimierende Pflanzen ist dafür keine Zulassung erforderlich) (4). Für 33 dieser transgenen Pflanzen (Mais, Sojabohnen, Baumwolle, Zuckerrüben, Raps, Reis) liegen entweder bereits Importgenehmigungen für die EU vor oder befinden sich Anträge im Zulassungsverfahren. Die für den Import in die EU beantragten 22 transgenen Hybridpflanzen (Mais, Baumwolle, Sojabohnen) mit „stacked events“ (Produkte konventioneller Kreuzung transgener Pflanzenlinien) sind allerdings im FDA-Verzeichnis bewerteter transgener Pflanzen (Stand: 07.11.2007) nicht enthalten.

Auch bei sorgfältiger Trennung der Warenströme kann nicht ausgeschlossen werden, dass aus Drittländern importierte Produkte Spuren von in der EU nicht oder noch nicht zugelassenen transgenen Pflanzen enthalten. Den für die Lebens- und Futtermittelüberwachung zuständigen Behörden obliegt es daher, durch entsprechende Analysen sicher zu stellen, dass solche Produkte nicht in den Handel gelangen. Die hierfür erforderlichen Nachweisverfahren sind in der Regel erst verfügbar, wenn Anträge auf Zulassung gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 vorliegen und eine Validierung der Verfahren durch das *Joint Research Centre* (JRC) der Europäischen Kommission erfolgt ist.

Codex Alimentarius

Der *Codex Alimentarius* ist eine Sammlung internationaler Lebensmittelnormen, die von der *Codex Alimentarius Commission* (CAC) herausgegeben werden. Die CAC wurde 1963 als gemeinsame Einrichtung der *Food and Agriculture Organisation* (FAO) und der *World Health Organisation* (WHO) gegründet. Ihr gehören derzeit 174 Staaten aus allen Regionen der Welt sowie die Europäische Kommission als solche an. Die CAC hat die Aufgabe, zum Schutz der Verbrauchergesundheit und im Interesse eines fairen Welt-handels entsprechende Normen (*Standards*), Richtlinien (*Guidelines*) und Empfehlungen (*Codes of Practice*) zu vereinbaren. Diese werden in waren- und problemspezifischen Komitees (z. B. *Codex Committee on Food Labelling*, *Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling*) oder *ad hoc*-Arbeitsgruppen (*Task Forces*) von Delegierten der Mitgliedstaaten erarbeitet, in einem bis zu acht Stufen umfassenden Verfahren (5) abgestimmt und von den jährlich stattfindenden Versammlungen der CAC beschlossen.

Die Codex-Normen, Richtlinien und Empfehlungen stellen die Basis dar, auf der die Mitgliedstaaten der CAC ihre lebensmittelrechtlichen Bestimmungen harmonisieren sollen. Zwar haben die Codex-Normen keine Rechtskraft. Sie erlangen jedoch zunehmende rechtliche Bedeutung durch die Übereinkommen über die Anwendung von gesundheits- und pflanzenschutzrechtlichen Maßnahmen (*Sanitary and Phytosanitary Measures*, SPS) und über technische Handelshemmnisse (*Technical Barriers to Trade*, TBT) im Rahmen der *World Trade Organisation* (WTO), wonach sie als Referenz im internationalen Lebensmittelhandel anerkannt werden und in den Streitbeilegungsverfahren bei Handelskonflikten eine maßgebliche Rolle spielen.

Ad hoc Task Force on Foods Derived from Biotechnology

Mit den Auswirkungen der Biotechnologie auf die internationalen Lebensmittelnormen und Verfahrensregeln hat sich die CAC erstmals in ihrer 18. Sitzung im Juli 1989 befasst. Anlass hierfür war eine Stellungnahme von US-Repräsentanten mit generellen Überlegungen zur Rolle der Biotechnologie für die Lebensmittelherstellung und zur Risikobewertung der resultierenden Produkte, verbunden mit der Aufforderung an FAO und WHO, Sicherheitsmaßstäbe und Richtlinien für diese Lebensmittel zu entwickeln,

um den Erfordernissen der neuen Technologie Rechnung zu tragen. In der Folge fand auf Einladung von FAO und WHO im November 1990 eine Beratung mit Experten über Strategien zur Sicherheitsbewertung von Lebensmitteln, die mit Hilfe der Biotechnologie hergestellt wurden, statt. Zu den im Bericht dieser Konsultationsveranstaltung enthaltenen Empfehlungen gehörte die Aufforderung an FAO und WHO, die Initiative für die Erarbeitung eines harmonisierten Verfahrens der von den nationalen Regierungen zu verantwortenden Sicherheitsbewertung biotechnologisch hergestellter Lebensmittel zu ergreifen (6). Weitere FAO/WHO-Konsultationen und WHO-Workshops folgten in den Jahren 1993, 1994 und 1996.

Auf der Basis dieser Vorarbeiten beschloss die CAC auf ihrer Sitzung im Juni/Juli 1999 die Einrichtung der *Ad hoc Intergovernmental Task Force on Foods Derived from Biotechnology*, die sich unter der Leitung Japans für die Dauer von vier Jahren mit den möglichen Auswirkungen der modernen Biotechnologie bei der Lebensmittelherstellung auf die Lebensmittelsicherheit befassen sollte. Das Mandat dieser *Codex Task Force* schloss die Befassung mit Umweltaspekten, die im *Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity* (CBD) berücksichtigt sind, mit Kennzeichnungsfragen, die vom *Codex Committee on Food Labelling* (CCFL) bearbeitet werden, sowie mit in den Zuständigkeitsbereich der Mitgliedstaaten fallenden Risikomanagement-Maßnahmen aus.

Die erste Tagung der *Codex Task Force* fand im März 2000 statt. Nach dem erfolgreichen Abschluss des Arbeitsprogramms der *Codex Task Force* beschloss die CAC in ihrer Sitzung vom 28. Juni bis 3. Juli 2004 die Verlängerung deren Mandats für weitere vier Jahre. An den Sitzungen der *Codex Task Force* nahmen während der ersten Periode von 2000 bis 2003 Vertreter von jeweils zwischen 33-36 Mitgliedstaaten und von 14-18 Nicht-Regierungsorganisationen der Wirtschaft sowie von Umwelt- und Verbraucherschützern teil, darunter die *European Association for Bioindustries* (EUROPABIO), das *International Life Sciences Institute* (ILSI), *Consumer International* (CI) und *Greenpeace International*. Während der zweiten Periode von 2005 bis 2007 erhöhte sich die Zahl der an den Sitzungen teilnehmenden Mitgliedstaaten auf 40-52, die der Nicht-Regierungsorganisationen ging zurück auf 11-15.

Während ihrer ersten vierjährigen Arbeitsperiode wurden von der *Codex Task Force* folgende Richtlinien erarbeitet:

- *Principles for the Risk Analysis of Foods Derived from Modern Biotechnology,*
- *Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Plants (Codex Plant Guideline),*
- *Annex: Assessment of Possible Allergenicity,*
- *Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Produced Using Recombinant-DNA Microorganisms,*

die von der CAC während ihrer Tagung vom 30.06.-07.07.2003 akzeptiert wurden (7).

Nach Abschluss der zweiten Arbeitsperiode wurden von der *Codex Task Force* in ihrer letzten Sitzung vom 19. bis 23. September 2007 die folgende Richtlinie und folgende Anhänge zur *Codex Plant Guideline* verabschiedet (8):

- *Draft Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Animals,*
- *Draft Annex: Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Plants Modified for Nutritional or Health Benefits,*
- *Draft Annex: Food Safety Assessment in Situations of Low-level Presence of Recombinant-DNA Plant Material in Food.*

Für diese Dokumente wurde von der *Task Force* ein beschleunigtes Abstimmungsverfahren beschlossen (Steps 5/8). Damit entfiel die Möglichkeit zur erneuten Kommentierung aller Aspekte der Richtlinienentwürfe durch die Mitgliedstaaten und interessierten internationalen Organisationen (Steps 6 und 7). Die Kommentierung der Entwürfe hinsichtlich möglicher ökonomischer Implikationen war bis zum 15. März 2008 möglich (Step 5). Zusammen mit den eingegangenen Kommentaren werden die Entwürfe dem *Executive Committee* zur kritischen Durchsicht und zur Weiterleitung an die CAC zur Entscheidung in deren nächster Sitzung vom 30. Juni bis 5. Juli 2008 übermittelt (Step 8).

Draft Annex: Food Safety Assessment in Situations of Low-level Presence of Recombinant-DNA Plant Material in Food

Zur Erarbeitung des Entwurfs für einen Anhang zur *Codex Plant Guidelines* für die Bewertung der Lebensmittelsicherheit im Fall von Produkten, die Spuren von Material aus im Importland nicht zugelassenen transgenen Pflanzen enthalten, war von der *Codex Task Force* eine Arbeitsgruppe unter Leitung der USA, Deutschlands und Thailands eingerichtet worden.

Der in der letzten Sitzung der *Codex Task Force* verabschiedete Entwurf des Anhangs besteht aus der Präambel, u.a. mit einer Beschreibung des Anwendungsbereichs, und zwei weiteren Teilen, in denen die im Fall des Vorkommens geringfügiger Mengen transgenen Pflanzenmaterials in Lebensmitteln für die Sicherheitsbewertung relevanten Abschnitte der *Codex Plant Guideline* benannt werden bzw. die Regelungen für den Austausch von Informationen und Daten festgelegt sind, die im Importland zur Durchführung der Lebensmittelkontrolle und der Sicherheitsbewertung für notwendig erachtet werden.

Anwendungsbereich

Der Anhang zur *Codex Plant Guideline* soll nur im Fall von transgenen Pflanzen zur Anwendung kommen, für die eine Sicherheitsbewertung mit positivem Ergebnis gemäß den Anforderungen der *Codex Plant Guideline* in mindestens einem Codex-Mitgliedstaat durchgeführt wurde.

Zum Anwendungsbereich des Anhangs gehören

- Schüttgüter wie Maiskörner, Sojabohnen oder Ölsaatsamen, die in der Regel als Rohstoffe zur Verarbeitung als Lebensmittelzutaten bestimmt sind, sowie
- Früchte und Gemüse wie Tomaten, Kartoffeln, Papaya, die als solche als Lebensmittel zum Verzehr gelangen können,

unter der Voraussetzung, dass der von gentechnisch veränderten Sorten stammende Anteil unbeabsichtigt und nur in geringem Umfang in die zur Lebensmittelherstellung bestimmten Exportgüter gelangt ist.

Der Anhang

- beinhaltet keine Risikomanagement-Maßnahmen, wie z.B. die Entscheidung, ab welcher Höhe des Anteils an Spuren nicht zugelassenen transgenen Pflanzenmaterials in Lebensmitteln die Bestimmungen dieses Anhangs zur Anwendung kommen sollen;
- hindert die Mitgliedstaaten nicht daran, in jedem Fall eine Sicherheitsbewertung gemäß den Vorgaben der *Codex Plant Guideline* durchzuführen und im Rahmen einschlägiger nationaler Rechtsvorschriften zu entscheiden, wann und wie dieser Anhang zur Geltung kommen soll;
- enthebt Unternehmen, Exporteure und zuständige nationale Behörden nicht der Verantwortung, den jeweils einschlägigen Importbestimmungen, darunter solche für nicht zugelassenes transgenes Pflanzenmaterial, Rechnung zu tragen.

Sicherheitsbewertung

Folgende Daten und Informationen sind Voraussetzung für die Bewertung der Lebensmittelsicherheit im Fall von Produkten, die Spuren von transgenem Pflanzenmaterial enthalten:

- Beschreibung der transgenen Pflanze, der Empfängerpflanze und der Spenderorganismen,
- Beschreibung der Transformationsmethode und der verwendeten DNA,
- Molekulare und biochemische Charakterisierung der genetischen Modifikation,
- Bewertung der potentiellen Toxizität und Allergenität neu exprimierter Substanzen,
- Bewertung von Antibiotikaresistenzgenen (sofern vorhanden).

Ausgehend von einem geringen Anteil transgenen Pflanzenmaterials im Lebensmittel wird auf einige der in der *Codex Plant Guideline* vorgesehenen Anforderungen verzichtet. Der Schwerpunkt liegt auf der Bewertung der Transgene und der neu exprimierten Proteine. Die vergleichende Inhaltsstoffanalyse wird beschränkt auf die in den Empfängerpflanzen natürlich vorkommenden Toxine und Allergene beispielsweise im Fall von Produkten, die als solche als Lebensmittel verzehrt werden können, wie Obst und Gemüse. Die Bestimmung des Gehalts an möglichen Metaboliten von Expressionsprodukten wird nur für die essbaren Teile der Pflanzen gefordert. Verzichtet wird auch auf Ex-

positionsdaten sowie auf Untersuchungen zu möglichen Veränderungen der Bioverfügbarkeit von Nährstoffen und auf die für solche Pflanzen geltenden zusätzlichen Anforderungen, die gezielt hinsichtlich ihres Nährwerts oder ihrer Funktion modifiziert wurden.

Informations- und Datenaustausch

Um den Anhang zur *Codex Plant Guideline* im Fall von importierten Lebensmitteln, die Spuren von im Importland nicht zugelassenem transgenem Pflanzenmaterial enthalten, für die Mitgliedstaaten nutzbar zu machen, sollen diese schnellstmöglichen Zugang zu folgenden Informationen erhalten:

- Name des Antragstellers,
- Zusammenfassung des Antrags,
- Mitgliedstaat, in dem die Zulassung erteilt wurde,
- Datum der Zulassung,
- Anwendungsbereich/Zweck der Zulassung (Lebensmittel und/oder Futtermittel sowie Anbau und/oder Import),
- Identifizierungscode (Unique Identifier) (9),
- Links zu Datenbanken anderer relevanter internationaler Organisationen mit Informationen zum betreffenden Produkt,
- Zusammenfassung der gemäß den Anforderungen der *Codex Plant Guideline* durchgeführten Sicherheitsbewertung,
- Kontaktadressen
 - zur Anforderung von Protokollen für Nachweisverfahren und von geeignetem Referenzmaterial,
 - der für die Sicherheitsbewertung zuständigen Behörde(n) und des Antragstellers.

Die **Mitgliedstaaten** sind aufgefordert,

- die vorgenannten Daten und Informationen zu übermitteln;
- in Übereinstimmung mit ihren rechtlichen Rahmenbedingungen anderen Mitgliedstaaten zusätzlich verfügbare Informationen bezüglich der von ihnen durchgeführten Sicherheitsbewertung zur Verfügung zu stellen;

- neue wissenschaftliche Erkenntnisse, die für das Ergebnis der entsprechend den Anforderungen der *Codex Plant Guideline* durchgeführten Sicherheitsbewertung relevant sein können, bereitzustellen.

Antragsteller sind aufgefordert,

- auf Anfrage weitere, für die Bewertung entsprechend des Anhangs zur *Codex Plant Guideline* erforderliche Informationen zur Verfügung zu stellen;
- unter Berücksichtigung des berechtigten Schutzes vertraulicher Informationen validierte Protokolle, die für den *Event*- oder *Trait*-spezifischen Nachweis von Spuren transgenen Pflanzenmaterials geeignet sind, und entsprechendes Referenzmaterial (in der Regel „non-viable“, unter Umständen „viable“) bereitzustellen.

Die **FAO** hat sich bereit erklärt, im Rahmen ihres *International Portal on Food Safety, Animal and Plant Health* (IPFSAPH) eine zentrale, öffentlich zugängliche Datenbank mit den vorgenannten Daten und Informationen einzurichten und zu diesem Zweck mit der OECD und anderen relevanten internationalen Organisationen zusammenzuarbeiten.

Als Grundlage für die IPFSAPH-Datenbank sollen zunächst die in der GVO-Produkt Datenbank der OECD (*Biotech Database for products derived using Modern Biotechnology* (10)) enthaltenen Daten (Organismen- und Herstellerlisten, Identifizierungs-codes) genutzt werden. Neue Einträge in der IPFSAPH-Datenbank sollen auch der OECD *Biotech Database* zur Verfügung gestellt werden. Das FAO-Sekretariat wird eine E-Mail-Adresse für die zentralisierte Dateneingabe durch die Mitgliedstaaten einrichten und für die Überprüfung der Daten auf Konsistenz und Korrektheit sorgen. Internet-Links zu offiziellen Datenquellen sollen genutzt werden, um die Aktualität der Daten zu gewährleisten.

Fazit

Der Nutzwert des hier vorgestellten Anhangs zur *Codex Plant Guideline* wird davon abhängen, ob die für die Bewertung der Lebensmittelsicherheit notwendigen Daten und Informationen rechtzeitig verfügbar sein werden. Dafür ist es erforderlich, dass alle Akteure den an sie gerichteten Forderungen nachkommen. Eine rechtsverbindliche Verpflichtung dazu besteht nicht.

Zwar gestattet der in diesem Anhang vorgesehene umfassende Informationsaustausch die Identifizierung, Quantifizierung und Sicherheitsbewertung geringer Spuren transgener Pflanzenmaterials in Lebensmitteln. Die damit möglicherweise zugleich verbundene Hoffnung einiger Mitgliedsstaaten auf öffentliche Akzeptanz solches nach international anerkannten Kriterien als unbedenklich bewerteten Spurenmaterials von GVO, die im Importland nicht oder noch nicht zugelassen sind, wird sich jedoch durch den Anhang allein - zumindest in den Mitgliedstaaten der EU - nicht erfüllen lassen. Dazu bedürfte es einer Abkehr von der in der EU geltenden Nulltoleranz, etwa durch Wiedereinführung des bis April 2007 geltenden Schwellenwertes für noch nicht zugelassene, aber bereits durch die EFSA positiv bewertete GVO.

Literatur

- (1) Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel, Amtsblatt der Europäischen Union L 268: 1-23, 18.10.2003
- (2) http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_print_en.cfm
- (3) http://europa.eu.int/comm/food/food/biotechnology/authorisation/public_comments_en.htm
- (4) <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/biocon.html> (Stand: 07.11.2007)
- (5) Codex Alimentarius Commission, Procedural Manual, Sixteenth edition, Rome 2006
- (6) Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology, Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO, Geneva, 1991
- (7) http://www.who.int/foodsafety/biotech/codex_taskforce/en/index.html
- (8) ALINORM 08/31/34, Report of the Seventh Session of the CODEX *Ad Hoc* Intergovernmental Task Force on Food Derived from Biotechnology, <http://www.codexalimentarius.net/web/archives.jsp?lang=en>
- (9) <http://www2.oecd.org/biotech/>
- (10) <http://webdomino1.oecd.org/ehs/bioprod.nsf>

ENGL – Nachweis nicht zugelassener GVO

Sven Pecoraro

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

85764 Oberschleißheim

Seit 1996 ist die globale Anbaufläche von gentechnisch veränderten (gv) Kulturpflanzen bis 2007 auf geschätzte 114 Mio. Hektar um das 67-fache angewachsen. 2007 bauten etwa 12 Mio. Landwirte in 23 Länder gv Pflanzen an. Allerdings entfielen 99 % der gesamten Anbaufläche auf acht Länder, angeführt von den USA und Argentinien, gefolgt von Brasilien und Kanada, sowie Indien, China, Paraguay und Südafrika. Die jährliche prozentuale Zunahme der Anbauflächen ist dabei seit 2002 bei den Entwicklungsländern insgesamt höher als bei den Industrieländern. Von den angebauten Kulturpflanzen deckten vier nahezu 100 % der gesamten Fläche ab. Demnach entfielen 51 % dieser Fläche auf Soja, 31 % auf Mais, 13 % auf Baumwolle und 5 % auf Raps.

Gegenwärtig gibt es etwa 18 verschiedene gentechnisch veränderte Pflanzenarten und über 140 Pflanzenlinien, die in mindestens einem Land der Welt als Lebens- und/oder Futtermittel zugelassen sind (Stand 03/2008). Dazu gehören unter anderem neben Papaya, Melone und Pflaume auch Kartoffel, Reis, Kürbis und Zuckerrübe sowie Chicorée, Linse, Sonnenblume und Weizen.

In Europa müssen gentechnisch veränderte Organismen (GVO), bevor sie als Lebens- oder Futtermittel auf den Markt gelangen dürfen, ein einheitliches Zulassungsverfahren durchlaufen, das unter anderem eine Sicherheitsbewertung durch die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) einschließt. Darüber hinaus ist vom Antragsteller eines zuzulassenden GVO ein geeignetes Nachweisverfahren einzureichen sowie geeignetes Referenzmaterial verfügbar zu machen.

Das Gemeinschaftsreferenzlabor der Kommission (CRL) und das Europäische Netzwerk für GVO Laboratorien (ENGL) überprüfen die eingereichten Methoden in einem mehrstufigen Validierungsverfahren auf praktische Eignung und der Einhaltung der vom ENGL festgelegten Kenngrößen (Minimum Performance Requirements, <http://gmo-crl.jrc.it/doc/Method%20requirements.pdf>).

Das Gemeinschaftliche Referenzlabor (CRL) ist insbesondere verantwortlich für:

- den Empfang, die Aufbereitung und Pflege der positiven und negativen Kontrollproben und ihre Verteilung an die nationalen Referenzlaboratorien
- die Evaluierung der Daten, die der Antragsteller zum Inverkehrbringen des Lebensmittels oder des Futtermittels zum vorgelegt hat
- die Untersuchung und Validierung der Verfahren zum Nachweis, einschließlich der Probenahme und der Identifizierung des Transformationsereignisses in dem Lebensmittel oder Futtermittel
- die Vorlage vollständiger Evaluierungsberichte bei der Behörde“ [EFSA]

Das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) ist als eines der nationalen Referenzlaboratorien für die Unterstützung des CRL benannt (VO (EG) Nr. 1981/2006, Anhang) und stellt mit dem Verfasser dieses Kurzberichtes einen von fünf deutschen Delegierten im ENGL.

Das 2002 auf Grundlage der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel gegründete Europäische Netzwerk für GVO Laboratorien (ENGL) besteht gegenwärtig (03/2008) aus 74 überwiegend staatlichen Laboratorien aus 27 EU Mitgliedsstaaten plus Norwegen.

Die Hauptaufgaben und Aktivitäten des ENGL sind:

- Bildung eines wissenschaftlichen und technischen EU Netzwerkes im Zusammenhang mit EU Regularien auf dem Gebiet der Gentechnik
- Unterstützung des Prozesses der Standardisierung und Harmonisierung von Methoden zur Probenahme, Nachweis, Identifikation und Quantifizierung von gentechnisch veränderten Organismen and daraus abgeleiteten Produkten inklusive Saatgut, Getreide, Lebensmittel, Futtermittel sowie Umweltproben
- Offizielles nationales Referenzlabor nach VO (EG) 1981/2006, Anhang II zur Unterstützung des Gemeinschaftlichen Referenzlabors der EU (CRL)
- Festlegung von Mindestanforderungen für Nachweismethoden, die der Antragsteller für einen GVO vorlegt
- Technologie- und Informationsaustausch zwischen den ENGL Mitgliedern

Zugelassene GVO müssen für den Handel nach festen Regeln gekennzeichnet werden. Den rechtlichen Rahmen hierfür setzten mehrere Europäische Verordnungen und Bestimmungen [VO (EG) 1829/2003, VO (EG) 1830/2003, VO (EG) 64/2004, VO (EG)1981/2006, RL 2001/18/EG]. In Europa ist gegenwärtig nur ein relativ kleiner Teil der weltweit kommerzialisierten GVO zugelassen.

Für in Europa nicht zugelassene GVO gilt eine Nulltoleranz, das bedeutet, dass solche GVO oder Bestandteile davon nicht auf den Markt gelangen dürfen. Im Zuge der globalen Warenströme kam es in der Vergangenheit jedoch wiederholt zu Kontaminationen von Produkten mit in der EU nicht zugelassenen GVO (UGM). So wurde 2004 vom LGL als erstes Labor in Europa ein nicht zugelassener GVO nachgewiesen. Diese virusresistente Papayalinie, die in den USA zugelassen ist, wurde offensichtlich bei der Ernte auf Hawaii mit konventioneller Ware vermischt. 2005 wurde bekannt, dass gentechnisch veränderter Mais (Bt 10) der Firma Syngenta, laut Firmenangaben aufgrund einer internen Verwechslung, in den Handel gelangte. In 2006 wurden verschiedene nicht zugelassene Reislinien aus den USA und Asien (LL 601, LL 62, Bt 63) auf dem Europäischen Markt festgestellt.

In solchen Fällen erfolgt jeweils eine Meldung über das Europäische Schnellwarnsystem (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF) an alle Mitgliedstaaten.

Das RASFF ist ein auf Grundlage der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts gebildetes System zur schnellen Mitteilung von Informationen über Lebens- und Futtermittlerisiken innerhalb der EU. Dadurch wird im Bedarfsfall ein gleichzeitiges Vorgehen der Mitgliedstaaten möglich. Es sind dabei zwei Arten von Meldungen zu unterscheiden. Die Warnmeldungen (Alert Notifications) betreffen die Lebens- und Futtermittel, die ein Risiko darstellen und die sich bereits auf dem Markt befinden. Die Mitgliedsstaaten sollen sofort handeln, indem die genannten Produkte vom Markt genommen werden. Bei den so genannten Informationsmeldungen (Information Notifications) werden Lebens- und Futtermittel zwar als Risiko erkannt, es besteht jedoch kein unmittelbarer Handlungsbedarf für die Mitgliedsstaaten. Dies betrifft z.B. Produkte, die in anderen Mitgliedsstaaten nicht auf den Markt gelangt sind oder bei Kontrollen an den Außengrenzen der EU zurückgewiesen wurden.

Aus Sicht der amtlichen Lebens- und Futtermittelüberwachung werfen diese Fälle grundsätzlich die Frage auf, wie solche UGM im Routinebetrieb analytisch erfasst werden können. Für GVO, die sich in der EU in der Zulassung befinden (z.B. Reis LL 62), aber noch nicht zugelassen sind, liegen meist Nachweisverfahren und Referenzmaterialien vor. Dagegen gibt es in der Regel keine Nachweisverfahren für GVO, die in außereuropäischen Ländern (gv Papaya, Reis LL 06) oder aber nirgendwo auf der Welt zugelassen sind.

Um erste Hinweise einer gentechnischen Veränderung zu erhalten, werden amtliche Proben üblicherweise mit DNA-basierenden Methoden auf genetische Elemente getestet, die in GVO allgemein weit verbreitet sind (z.B. p35S-Promotor, nos-Terminator). Bei UGM, die diese Elemente nicht enthalten, aber für die ein linienspezifischer, d.h. nur für einen bestimmten GVO spezifischen Nachweis verfügbar ist, kann direkt auf diesen GVO getestet werden. Ist der UGM hingegen unbekannt, so ist dieser in der Regel nur mit enormen analytischen Aufwand in einer Probe aufzuspüren.

Bis heute gibt es keine einheitlichen Empfehlungen, wie nicht zugelassene GVO gescreent und nachgewiesen werden sollten. Hinsichtlich einer ökonomischen und harmonisierten amtlichen Analytik wurde im Mai 2007 eine ad hoc Arbeitsgruppe des ENGL für nicht zugelassenen GVO gebildet („Working Group on Unauthorised GMO“, UGM WG). Aufgabe dieser Arbeitsgruppe ist die Erstellung von Leitlinien zur Analytik von nicht zugelassenen GVO, sowie zur einheitlichen Interpretation und Mitteilung von Analyseergebnissen. Erste Handlungsempfehlungen werden für Herbst 2008 erwartet.

Screeningstrategien

Rupert Hohegger

**AGES – Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
Kompetenzzentrum Biochemie
A-1226 Wien**

Einleitung

Der Anbau von gentechnisch veränderten Pflanzen (gv-Pflanzen, GVP) nimmt derzeit weltweit weiter zu. Die Anzahl an zugelassenen gv-Pflanzen hat die 100 längst überschritten, ein Großteil davon kann für Lebensmittel- und/oder Futtermittelzwecke verwendet werden. Neben der steigenden Anbaufläche ist weiterhin auch mit einer deutlichen Zunahme an Zulassungsanträgen zu rechnen. Seit April 2004 wurden 65 Zulassungsanträge nach VO EC 1829/2003 gestellt. Weiters existieren bestehende Zulassungen, welche nun laufend neu eingereicht werden müssen. Für das Jahr 2008 sind Anträge für weitere 50 Neuzulassungen angekündigt. Darin enthalten sind allerdings auch Kreuzungen von bereits bestehenden gv-Pflanzen (stacked events). Das führt zwangsweise auch zu einer steigenden Anzahl an unterschiedlichen gv-Pflanzen, die weltweit auf den Markt drängen und den Aufwand für die Analytik ausdehnen werden.

Auf den ersten Blick bringen die neuen EU-Regelungen an sich eine Erleichterung für die Analytik, da für die Überwachung der neuen gv-Pflanzen sowohl spezifische Nachweismethoden als auch die entsprechenden Kontrollproben vom Antragsteller zur Verfügung gestellt werden müssen. Diese Nachweismethoden werden im Gemeinschafts-Referenzlabor der EU (CRL) gemeinsam mit dem Europäischen Netzwerk der GVO-Laboratorien (ENGL) auf ihre Eignung überprüft und nach erfolgter Zulassung der Öffentlichkeit zugänglich gemacht. Eine Identifizierung und mengenmäßige Feststellung von etwaigen Vorkommen zugelassener GVO stellt somit die Analytik vor keine großen Herausforderungen mehr. In der Praxis stellt sich aber ein anderes Bild dar. Durch die steigende Anzahl an neuen Zulassungsanträgen steigt zwangsläufig auch der Anteil der noch nicht zugelassenen GVP bzw. GVO an. Für die noch nicht zugelassenen GVO fehlen jedoch häufig detaillierte Informationen über die gentechnische Veränderung, somit sind keine validierten und spezifischen Nachweisverfahren vorhanden. Hauptproblem ist aber das Fehlen von Kontrollproben bzw. Referenzmaterial für die Anwendung der Methoden in der Routineanalytik. Da ein spezifischer Nachweis in diesen Fäl-

len nicht möglich ist kommt gerade dem Screening eine immer wichtigere Rolle zu. Durch die geeignete Auswahl von verschiedenen Screeningelementen können nahezu alle EU-weit zugelassenen und nicht zugelassenen GVP erfasst werden. Die Notwendigkeit zur Etablierung von Screeningmethoden in der GVO-Analytik wurde durch das unbeabsichtigte Auftreten der gv-Reis-Linien LL601 und Bt63 unterstrichen, vor allem da für diese neuen gv-Events noch keine spezifischen Methoden bekannt waren. Ab diesem Zeitpunkt wurde in vielen Ländern der EU die Kontrolle auf nicht zugelassene gv-Bestandteile intensiviert.

Screeningelemente

Unter einem Screening (englisch für: Durchsiebung, Rasterung, Selektion, Durchleuchten) versteht man ein systematisches Testverfahren, um bestimmte Eigenschaften der Prüfobjekte zu identifizieren. Ein Screening ist somit ein auf bestimmte Kriterien ausgerichteter orientierender Siebtest. Für das Screening stehen diverse Screening-Elemente zur Verfügung, die Hinweise auf in der EU zugelassene, aber vor allem auch auf nicht zugelassene GVP liefern können. Dabei handelt es sich um DNA-Sequenzen die häufig in der Entwicklung von GVO anzutreffen sind. Durch gezielte Kombination verschiedener Screening-Elemente lassen sich daher Aussagen über die vorhandenen GV-Linien machen, auch wenn keine linienspezifischen Nachweisverfahren bekannt sind. Tritt ein Merkmalsprofil auf, welches für keinen zugelassenen GVO typisch ist, handelt es sich vermutlich um eine in der EU nicht zugelassene GV-Linie.

Besonders geeignete Screening-Elemente sind (siehe auch Tabelle 1):

- P-35S (CaMV 35S Promotor)
- NOS (Nopaline Synthase Terminator)
- PAT (Phosphinotricin N-Acetyltransferase aus *Streptomyces viridochromogenes*)
- CTP2-EPSPS (Übergang Chloroplasten-Transitpetid zu 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphat Synthase)
- BAR (Phosphinotricin N-Acetyltransferase aus *Streptomyces hygroscopicus*)
- nptII (Neomycin Phosphotransferase II)
- P-FMV (Figwort Mosaic Virus Promotor)
- GOX (Glyphosate Oxidase)

Mit Hilfe von Datenbanken kann bereits eine Vor-Auswahl geeigneter DNA-Sequenzen erfolgen, welche eine Eingrenzung der in Frage kommenden GV-Linien zulässt. Außerdem kann ein Datenbankvergleich Hinweise auf die Spezifität diverser Primersysteme liefern.

Die Verwendung dieser Screening-Elemente mittels Real Time PCR lässt auch eine semiquantitative Bestimmung von GV-Anteilen in der Untersuchungsmatrix zu. Das hat den besonderen Vorteil bei Proben die nur im Spurenbereich mit GV-Bestandteilen versetzt sind (zufällige und technisch unvermeidbare GV-Bestandteile) und daher in der Regel verkehrsfähig bzw. nicht kennzeichnungspflichtig sind.

Tabelle 1: Beispiel mit 5 Screeningelementen für gv-Rapslinien

Bezeichnung der GV-Linie (event)	EU Zulassung	DNA-Sequenzen (Screeningelemente)				
		RAPS	P-35S	T-NOS	CTP2-CP4EPSP S	BAR
23-198, 23-18-27 (Laurical)	nein	+	-	-	-	-
Falcon GS40/90	ja	+	-	-	-	+
GT200	ja	-	-	+	-	-
GT73	ja	-	-	+	-	-
HCN 10, HCN 92, Topas19/2 (LibertyLink)	ja	+	-	-	-	+
MS1, RF1, RF2; MS1xRF1 (PGS1) MS1xRF2 (PGS2) (SeedLink)	ja	-	+	-	+	-
MS8, RF3, MS8xRF3 (SeedLink)	ja	-	+	-	+	-
OXY 235	nein	+	+	-	-	-

+ = enthalten (laut Datenbank)

- = nicht enthalten (laut Datenbank)

Zum heutigen Stand sind 2 Screening-Technologien für den Routinebetrieb geeignet:

Real Time PCR (TaqMan-Technologie)

Ist die Methode der Wahl in der GVO-Analytik. Je nach Fragestellung kann die Real Time PCR qualitative, semiquantitative und/oder quantitative Aussagen treffen. Im Zuge der EU-Zulassung werden eventspezifische Methoden nach dem TaqMan-Prinzip (Primerpaar und Sonde) entwickelt und kommen im überwiegenden Teil der Labors der europäischen Gemeinschaft zur Identifizierung von gv-Events zum Einsatz. Für das Screening ist die Methode in gleicher Weise in Verwendung, wobei zurzeit standardisierte und validierte Real Time PCR Verfahren nicht in ausreichendem Umfang vorhan-

den sind. Der große Vorteil der Real Time PCR liegt einerseits in der Möglichkeit Aussagen über den Gehalt etwaiger gv-Bestandteile zu treffen, auch ohne Kalibrierstandards zu verwenden. Der Vergleich der Ct-Werte von artspezifischer und gv-linienspezifischer Real Time PCR ermöglicht diese semiquantitative Abschätzung des GVO-Gehalts. Der Einsatz der Hybridisierungssonden macht die Methode sensitiv und sehr zuverlässig und liefert die nötige Sicherheit in den Ergebnissen. Die Real Time PCR erlaubt eine hohe Flexibilität, da man sehr spezifisch auf die Anforderungen der Probenmatrix reagieren kann. Zusätzlich können neu nachzuweisende Sequenzen schnell etabliert und validiert werden.

Zusätzliche Flexibilität und Kosteneinsparungsmöglichkeiten sind bei Anwendung von Duplex- und Triplex-Verfahren gegeben, die bei entsprechender Kombination zu einer deutlichen Reduktion des Ressourcenaufwandes beitragen können. Die Sensitivität und Robustheit dieser „Multimethoden“ kann aber mit den Single-PCR Verfahren noch nicht Schritt halten und sind für den Routineeinsatz nur beschränkt geeignet.

Microarray (DNA-Microarrays)

Es gibt verschiedene Formen von Microarrays, die auch als "Genchips" oder "Biochips" bezeichnet werden, weil sie wie ein Computerchip viele Informationen auf kleinstem Raum enthalten können. Es gibt hauptsächlich zwei verschiedene Arten von DNA-Microarrays, einerseits solche die auf gebundener cDNA und solche die auf synthetisch hergestellten Oligonukleotiden beruhen. Der DualChip® von Eppendorf hat oberflächengebundene DNA-Moleküle, welche mit komplementären Nukleinsäuren hybridisieren, um gentechnisch veränderte DNA-Sequenzen aufzuspüren. Die Primer sind biotinyliert, somit können die gebildeten Biotin-Amplikons über eine Antigen-Antikörperreaktion nachgewiesen werden. Im Falle des DualChip® erfolgt der eigentliche Nachweis der gv-DNA-Sequenzen über eine abschließende Silberfärbung eines Anti-Biotin-Gold-Konjugats, bei all jenen Proben, wo eine erfolgreiche Hybridisierung stattgefunden hat. Voraussetzung für die Hybridisierung sind 4 parallel verlaufende Multiplex-PCR Ansätze, wofür keine Real Time PCR Geräte notwendig sind.

Der DualChip® von Eppendorf bedient sich auch jener genetischen Elemente, die häufig im Screening mit der Real Time PCR verwendet werden:

- P-35S (CaMV 35S Promotor)
- NOS (Nopaline Synthase Terminator)
- PAT (Phosphinotricin N-Acetyltransferase)

- EPSPS (5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphat Synthase, 2 Varianten)
- Cry1Ab (cry1Ab delta Endotoxin, 3 Varianten)
- P-NOS-NPTII (Übergangsbereich von NOS-Promotor und Neomycinphosphotransferase)

Zur Feststellung welche Kulturarten in der Probe vorhanden sind und zur Kontrolle, ob die extrahierte DNA amplifizierbar ist, werden auch artspezifische Sequenzen auf dem Chip nachgewiesen:

- Invertase (Mais)
- Lectin (Sojabohne)
- Cruciferin (Raps)
- RuBiscCo (Pflanzen allgemein)
- ORFIII (CaMV, Blumenkohlmosaikvirus)

Der DualChip® erfüllt laut Validierungsstudie die Anforderungen an Spezifität und Sensitivität und ist somit für ein Screening in der Routineanalytik geeignet. Vorteilhaft ist die große Anzahl an Informationen, die über eine Probe erhalten wird. Der Informationsgehalt kann auch jederzeit durch Anpassung des Chips erweitert werden. Der gravierende Nachteil des Microarray-Systems von Eppendorf liegt zurzeit in der fehlenden Möglichkeit zu semiquantitativen bzw. quantitativen Aussagen. Vor allem bei der Untersuchung von Lebensmittel auf gentechnisch veränderte Bestandteile können weitere Tests in den meisten Fällen unterbleiben, da GV-positive Proben fast ausschließlich im Spurenbereich angesiedelt sind (unterhalb von 0,1%). GV-positive Ergebnisse müssen bei der Chip-Technologie einer zusätzlichen Quantifizierung unterzogen werden. Durch den höheren Arbeitsaufwand pro Probe, bedingt vor allem durch die zusätzliche Färbeprozedur und der eingeschränkten Automatisierbarkeit der Chiptechnologie sprechen mehr Argumente zurzeit für eine Verwendung der Real Time PCR in der Routineanalytik, auch besteht keine zusätzliche Abhängigkeit von kommerziellen Systemen. Ein Vergleich der beiden Verfahren ist in Tabelle 2 abgebildet.

Tabelle 2: Vor- und Nachteile des Eppendorf DualChip® im Vergleich zur Real Time PCR

	Real Time PCR	DualChip® Eppendorf
Sensitivität	5-10 Kopien	10-50 Kopien (je nach Element)
Informationsgehalt* / Flexibilität	beschränkt / sehr flexibel	hoch / beschränkt
Quantifizierung	ja	nein
Automatisierungsmöglichkeit	ja	beschränkt
Arbeitsaufwand*	mittel (min. 16 Proben/Tag)	hoch (max. 8 Proben/Tag)
Kosten für Material*	mittel (ca. 50 €/Probe)	hoch (ca. 90 €/Probe)

* Voraussetzung für die Vergleichbarkeit: 6 Ansätze Real Time PCR, 14 Screening-Elemente Dual Chip®

Screeningstrategien

Durch die Vielzahl an GV-Linien ist bereits beim Screening die Anwendung geeigneter Strategien zur Vorausscheidung sinnvoll, um den Untersuchungsaufwand zu minimieren bzw. die Effektivität in der Analytik zu optimieren.

Ein wesentlicher Punkt bei der Umsetzung der EU-Verordnungen bzw. Richtlinien ist die Überwachung der Einhaltung auch auf analytischer Ebene. Zum einen sollen Saatgut, Lebensmittel und Futtermittel im Zusammenhang mit GVO auf deren Deklarationspflicht hin kontrolliert werden, zum anderen, ob in der EU nicht zugelassene GVO oder daraus hergestellte Materialien enthalten sind. Weiterhin sind Unterschiede in der Zusammensetzung, besonders von Lebens- und Futtermitteln in der Analytik zu berücksichtigen.

Hauptkriterium zur Festlegung der Screeningstrategie bildet die vorliegende Untersuchungsmatrix. Je nachdem, ob es sich um Saatgut, Futtermittel oder Lebensmittel handelt, ist eine Anpassung der Screening-Strategie erforderlich. Am einfachsten stellt sich die Situation für das Saatgut-Screening dar, weil keine artfremden DNA-Sequenzen zu erwarten sind. Außerdem kann bei Saatgut eine geringe Wahrscheinlichkeit auf Vorhandensein von gv-Bestandteilen vorausgesetzt werden. Die Miteinbeziehung von nicht zugelassenen gv-Events macht allerdings auch bei Saatgut eine Erweiterung des Analysenumfanges erforderlich. Lebens- und Futtermittel stellen aufgrund der oft komplexen Zusammensetzung und der daraus resultierenden Problematik bei der DNA-Gewinnung eine höhere Anforderung an die Analytik. Besonders Futtermittel durch ihre mannigfaltige Zusammensetzung sind für ein Screening prädestiniert. Die Auswahl der Screening-Elemente wird durch das P-35S und NOS-Signal der RoundupReady-Sojabohne erschwert, da diese gv-Sojalinie in ungefähr 80% (Untersuchungszahlen aus Österreich) der untersuchten Proben anzutreffen ist. Bei Anwesenheit von Roun-

dupReady-Soja ist somit ein Screening mit P-35S und NOS wirkungslos, da diese Elemente automatisch als nachweisbar auszuweisen sind und viele andere gv-Linien, auch von anderen Kulturarten, überdecken können. Abhilfe schafft hier nur eine Erweiterung des Analysenumfanges um weitere Screeningelemente und/oder diverse Identifizierungs-PCRs mit spezifischen Primersystemen, womit sich die Futtermittelanalytik zurzeit als sehr aufwändig erweist. Beispiele für Screening-Varianten, welche alle auch die Überprüfung auf nicht zugelassene gv-Events beinhalten, sind in den Abbildungen 1-3 angeführt.

Großen Einfluss auf die Screening-Strategie hat auch der Auftraggeber. Je nachdem, ob es sich um Untersuchungen im Rahmen der amtlichen Kontrolle oder ob es sich um Privataufträge handelt, sind unterschiedliche Vorgehensweisen notwendig. Behördliche (amtliche) Proben durchlaufen dabei in den meisten Fällen das vollständige Untersuchungsprogramm (Screening, Identifizierung, Quantifizierung), sofern es Hinweise auf GV-Sequenzen gibt. Der Fokus liegt auf dem eindeutigen und sicheren Nachweis etwaiger GV-Bestandteile. Privatkunden geben sich aus Kostengründen meist mit der Minimalvariante zufrieden, Hauptaugenmerk liegt auf der gesicherten Abwesenheit von GV-Sequenzen.

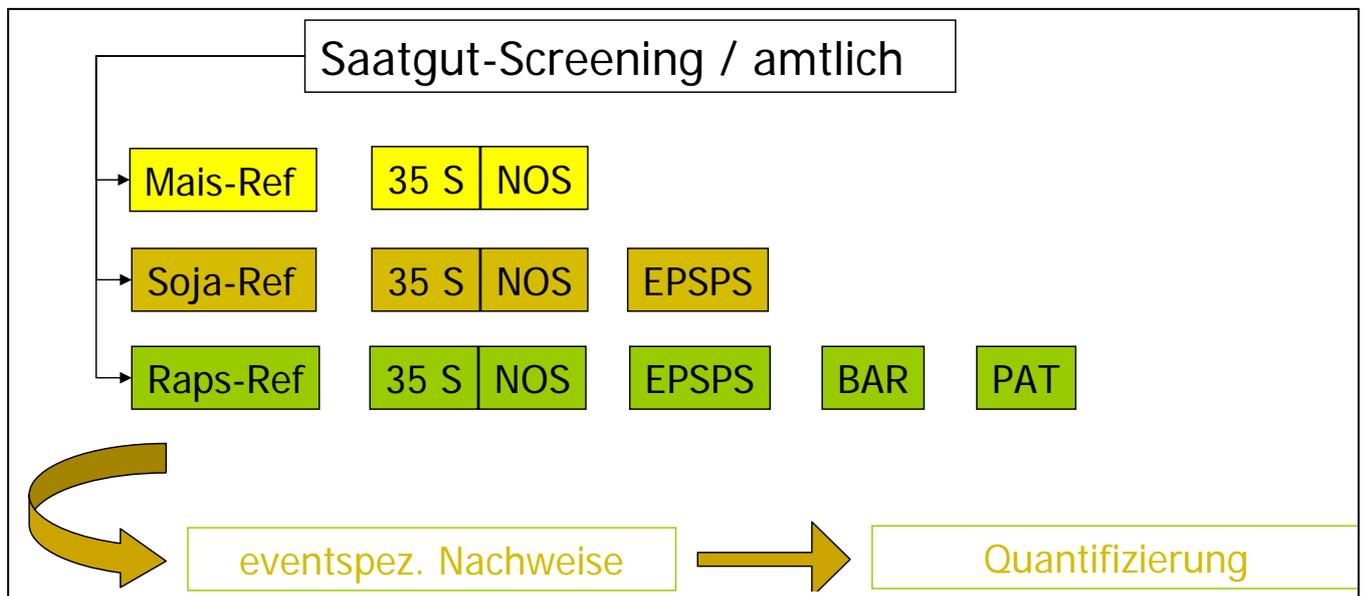


Abbildung 1: Beispiel für eine Screening-Strategie bei Saatgut

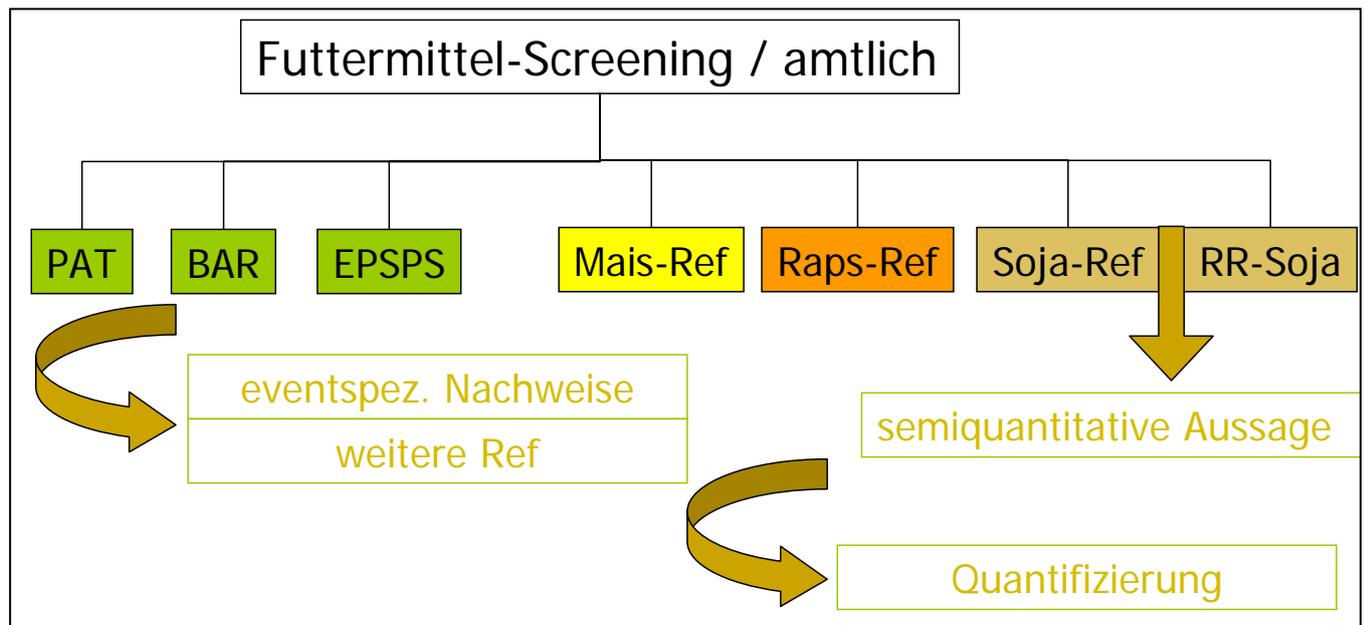


Abbildung 2: Beispiel für eine Screening-Strategie bei Futtermittel

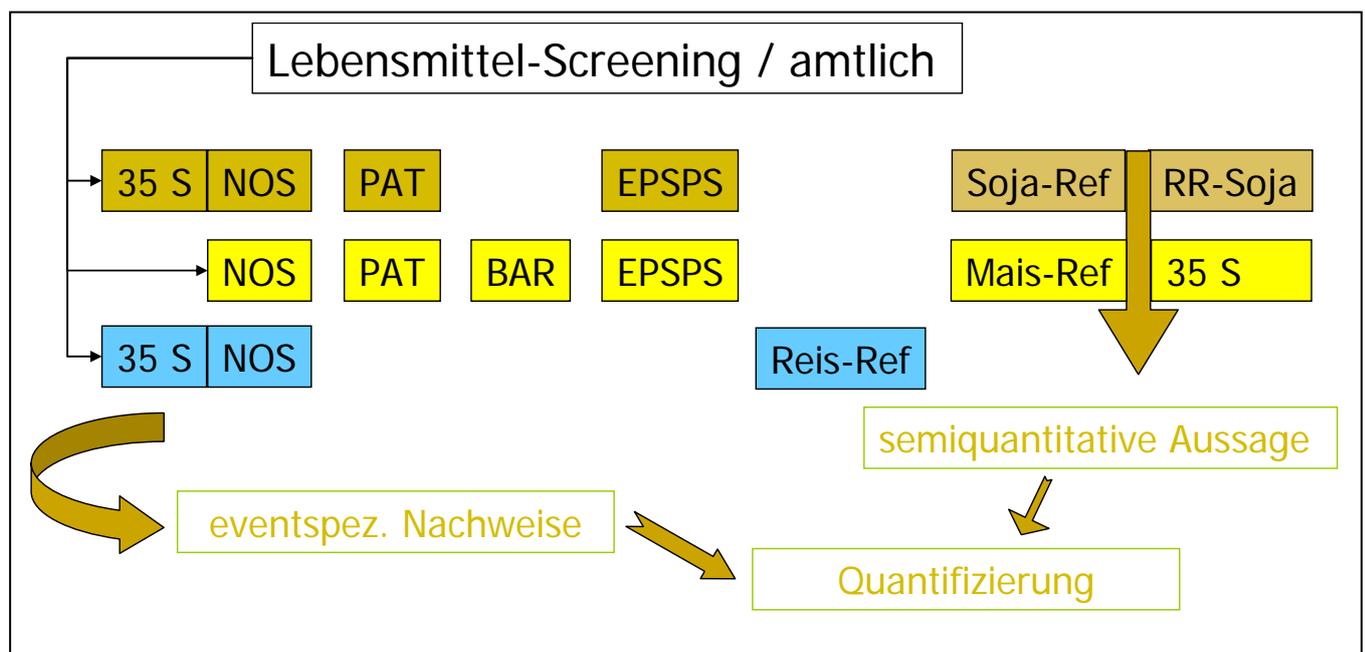


Abbildung 3: Beispiel für eine Screening-Strategie bei Lebensmittel

Ausblick

Eine Erweiterung des Routine-Screenings mittels Real Time PCR ergibt sich durch die Verwendung von ready-to-use Nachweissystemen. Dabei werden ausgewählte Screeningelemente bzw. die entsprechenden Primersysteme in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten gespottet. Der Vorteil liegt sicherlich im geringeren Arbeitsaufwand und einer höheren Flexibilität gegenüber der Chip-Technologie. Außerdem sind keine zusätzli-

chen Aufwendungen hinsichtlich Technologie und Methodik erforderlich. Sollte das 96-well Format durch die steigende Anzahl an Screeningelementen bzw. gv-Events für einen ausreichenden Probendurchsatz nicht mehr ausreichen, ist der Umstieg auf das 384-well Format zu erwarten.

Für die Verwendung der Real Time PCR auch bei künftigen Analysen auf GVO sprechen die vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten die sich durch den vermehrten Einsatz von Duplex-, Triplex- und Multiplexmethoden ergeben werden. Einen wichtigen Faktor wird auch die Automatisierbarkeit der Arbeitsabläufe spielen.

Entwicklungen im Bereich der Array-Technologie werden in Zukunft auch quantitative Analysen zulassen, somit wird der gravierende Nachteil der Chips wegfallen.

Problematisch für das GV-Screening ist die Vermeidung von häufig verwendeten DNA-Elementen bzw. die Entwicklung von völlig neuen gentechnisch veränderten Pflanzen. Hier fehlen oft die allseits bekannten Promotor- und Terminatorsequenzen, ein Screening mit wenigen Screeningelementen wird nicht ausreichen um alle gv-Events zu erfassen (Beispiel: Sojabohne DP-305423). Das Screening muss in diesen Fällen mit linespezifischen Methoden ergänzt werden. Die kurzfristige Zukunft der GV-Analytik wird aus einer Kombination verschiedener Methoden und Strategien bestehen, um den Aufwand in einem vertretbaren Umfang zu halten.

LINKS und Literatur

VO (EG) Nr. 1829/2003: Amtsblatt der Europäischen Union L 268/1 vom 18.10.2003

VO (EG) Nr. 1830/2003: Amtsblatt der Europäischen Union L 268/24 vom 18.10.2003

VO (EG) Nr. 65/2004: Amtsblatt der Europäischen Union L 10/5 vom 16.01.2004

VO (EG) Nr. 641/2004: Amtsblatt der Europäischen Union L 102/14 vom 07.04.2004

Empfehlung der Kommission: Amtsblatt der Europäischen Union L 348/18 vom 24.11.2004

Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA): <http://www.efsa.eu.int>

Community Reference Laboratory (CRL): <http://gmo-crl.jrc.it>

European Network of GMO Laboratories (ENGL): <http://engl.jrc.it>

Joint Research Centre (JRC): <http://www.jrc.cec.eu.int>

Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH: <http://www.ages.at>

Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend: <http://www.bmfgj.gv.at>

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: <http://www.bvl.bund.de>

Homepage von TransGen: <http://www.transgen.de>

Sequenzpolymorphismen bei endogenen Referenzgenen

Daniel Suter

**Bundesamt für Gesundheit BAG; Direktionsbereich Verbraucherschutz;
3003 Bern; Schweiz**

Der Verkauf oder Vertrieb von Lebensmitteln, hergestellt aus Produkten, welche aus gentechnisch veränderten Organismen (GVO) bestehen, bedürfen in der Schweiz sowie in anderen europäischen Ländern einer Bewilligung durch die nationalen Behörden. Zudem besteht eine Kennzeichnungspflicht derjenigen Produkte, bei denen mehr als 0.9 Masseprozent einer Zutat aus gentechnisch veränderten und bewilligten Organismen bestehen. Zur Überprüfung der Einhaltung dieser Vorschriften erheben einerseits die vollziehenden kantonalen Behörden (die Kantonalen Laboratorien) Kontrolluntersuchungen der auf dem Markt erhältlichen Produkte. Andererseits werden im Zuge der Selbstkontrollen die Rohstoffe von den Lebensmittel produzierenden Industrien selbst oder von privaten Laboratorien im Auftrag dieser auf ein Vorhandensein von GVO untersucht. Um der Kennzeichnungspflicht von GVO Produkten gerecht werden zu können, ist eine genaue mengenmässige Bestimmung des GVO Gehaltes nötig. Dabei bedienen sich die heute übliche Analysemethoden vorwiegend der Technik der quantitativen real-time Polymerase Kettenreaktion (real-time PCR). Bei diesem Verfahren wird ein Bereich der spezifischen Sequenz (Nukleinsäureabfolge im Erbgut des Pflanzenmaterials), der durch die gentechnische Veränderung neu entstanden ist, vervielfältigt und auf damit nachgewiesen. Um eine mengenmässige Aussage machen zu können, wird in einer zweiten, parallel zur GVO-spezifischen PCR Analyse der Gehalt eines endogenen, pflanzenspezifischen Referenzgens bestimmt. Da dieser Gehalt an endogenem Referenzgen eine Aussage darüber erlaubt, wie viel PCR Analyse Signal von der zu untersuchenden Pflanzensorte (gemeinsamer Gehalt an natürlicher Pflanzensorte plus GVO Pflanzensorte) zu erwarten ist, kann, in Kombination mit dem GVO-spezifischen Signal, der GVO Anteil relativ zum Verhältnis des Totalgehalts des entsprechenden Pflanzenmaterials erhoben werden. Es handelt sich bei diesem Vorgehen also um eine relative (nicht eine absolute) Mengenbestimmung. So wird ermöglicht, dass auch in zusammengesetzten Lebensmitteln der GVO Gehalt in Bezug auf den einzelnen Pflanzenbestandteil ermittelt werden kann. Darüber hinaus garantiert dieses relative Quantifizie-

rungsverfahren, dass Messunsicherheiten in der Bestimmung des DNA Gehalts der zu untersuchenden Lebensmittel auf das Analyseresultat ohne Einfluss bleiben. Ebenso können dadurch PCR inhibitorische Effekte, die sich in einigen Lebensmitteln manifestieren, egalisiert werden. Es ist aber wichtig zu erkennen, dass diese relative Quantifizierung lediglich dann zu einem zuverlässigen Resultat führt, wenn das verwendete endogene Referenzgen bestimmten Anforderungen entspricht. Es sollte unter den vielen im internationalen Anbau verwendeten Varietäten einer Pflanzensorte in möglichst nur einer Kopie im Genom vorliegen, oder, falls mehrere Kopien vorkommen, sollte deren Anzahl in verschiedenen Varietäten derselben Pflanzenart gleich bleibend sein. Andernfalls würde eine falsche Normierung vorgenommen. Ähnlich könnten sich auch Unterschiede in der exakten Sequenz des Referenzgens zwischen den Varietäten auswirken. Der PCR Nachweis zur Normierung würde dadurch bei einer Pflanzensorte normal funktionieren, während er bei einer anderen Varietät mit veränderter Sequenz, ein verschiedenes (geringeres) Resultat liefern würde. Diese Voraussetzungen sind für die endogenen Referenzgene nicht a priori gegeben, und in der Literatur sind bereits einige der erwähnten Unterschiede beschrieben.

In der hier beschriebenen Arbeit haben wir deshalb zuerst zu ergründen versucht, ob unter den in der Schweiz zugelassenen und auf dem Markt erhältlichen Varietäten von Mais und Soja Unterschiede in der Kopienzahl von häufig verwendeten endogenen Referenzgenen zu finden sind. Als maisspezifische Referenzgene haben wir das Invertase, das Zein und das high mobility group protein Gen untersucht, während für Soja die Kopienzahl des Lectin Gens in verschiedenen Varietäten analysiert wurde. Diese Messungen wurde mit Hilfe einer quantitativen real-time PCR Analyse durchgeführt. In Abb. 1 ist festgehalten, dass in allen der 24 untersuchten Soja Varietäten ein vergleichbares PCR Signal für das endogene Lectin Gen erzielt wurde. Dieses Gen scheint also in den analysierten Proben keine Schwankungen in der Kopienzahl seines Gens unter den analysierten Pflanzen Varietäten aufzuweisen.

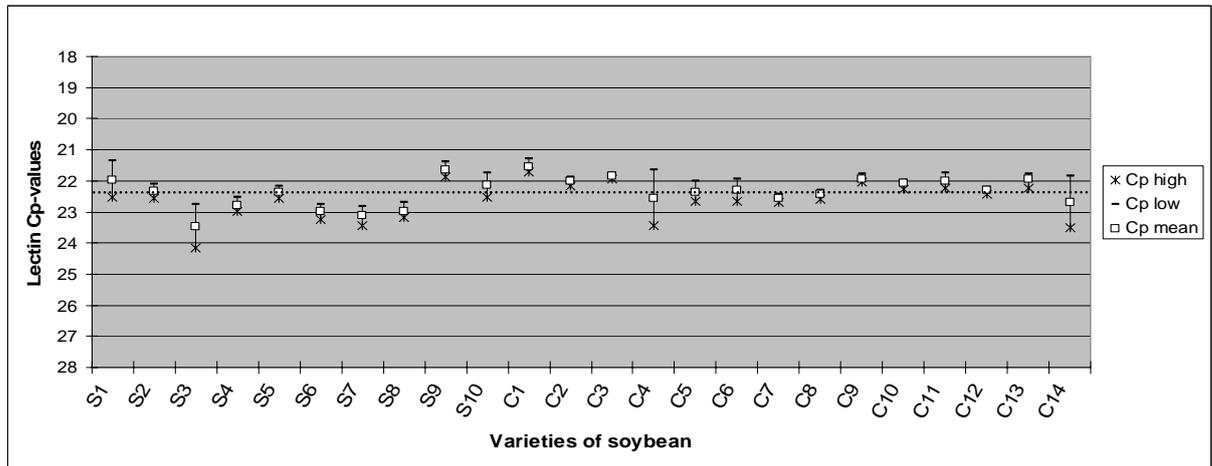


Abb 1: Messung des endogenen Soja Referenzgens Lectin in verschiedenen Varietäten

Nicht so klar zeigte sich dagegen das Bild der drei maisspezifischen Referenzgene Invertase (ivr), Zein (zein) und high mobility group protein (hmg) in Abb. 2.

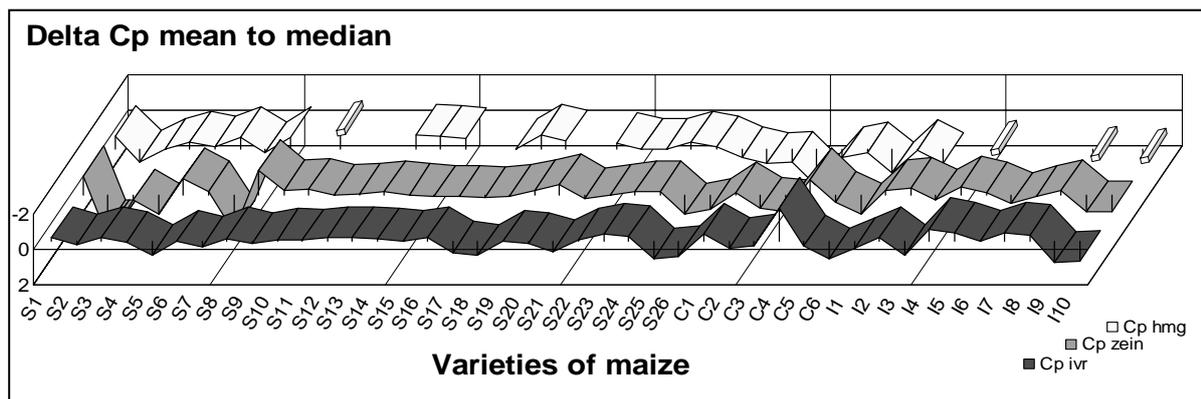


Abb 2: Messung von drei endogenen Mais Referenzgenen in verschiedenen Varietäten

Die Messwerte streuen unter den verschiedenen Varietäten um bis zu drei Einheiten (Cp values) für das Invertase Gen, was einem acht-fachen Unterschied der Gen Kopien gleichkommt (die in einem real-time PCR gemessenen Cp-Einheiten geben ein Mass der Gen Kopien in logarithmischer Wertigkeit wieder). Bei der Zein Messung ergab sich sogar ein bis zu 15-facher Unterschied unter den gemessenen Varietäten (die logarithmischen Cp-Werte streuen um bis zu 3.9 Einheiten). Ähnlich weisen auch die Messungen für das hmg Gen eine Streuung von bis zu Faktor 7.5 (2.9 Cp-Werte) auf. Nicht gezeigt ist in dieser Abbildung 2, dass die Messpunkte der einzelnen Pflanzen Varietäten den Mittelwert von 6 Einzelmessungen darstellen, die für jede Probe erhoben wurden. Diese Einzelmessungen streuen für einige Proben in sich bereits derart stark, dass wir es nicht wagten zu behaupten, die Unterschiede, die man in Abbildung 2 zwischen den

einzelnen Varietäten erkennt, seien aufgrund von unterschiedlichen Kopienzahlen des betreffenden Referenzgens entstanden. Mit unserem experimentellen Versuchsansatz können wir also keine unterschiedlichen Gen Kopien bei den drei untersuchten Mais und dem einen Soja spezifischen endogenen Referenzgen aufzeigen.

Aufgefallen ist uns aber, ursprünglich nur bei der hmg Gen Messung, dass einige Proben ein „unzuverlässiges“ real-time PCR Signal lieferten. Beim hmg System wurden gar von 42 getesteten Pflanzen Varietäten lediglich bei deren 32 ein Signal erzeugt (Lücken in Abb 2). In 10 Proben konnten also mit dem von uns eingesetzten PCR System kein hmg Gen vervielfältigt werden. In solchen Proben wäre eine GVO Quantifizierung, basierend auch einer Normalisierung durch eine hmg Messung, unmöglich. Als wir die Vervielfältigungskurve, die bei einer real-time PCR Messung erzeugt wird, genauer betrachteten, erkannten wir, dass nicht nur einzelne Proben kein Signal lieferten (#2 in Abb.3), sondern dass auch Signale anderer Proben einen veränderten, gedämpften Kurvenverlauf erzeugten (#1 in Abb.3).

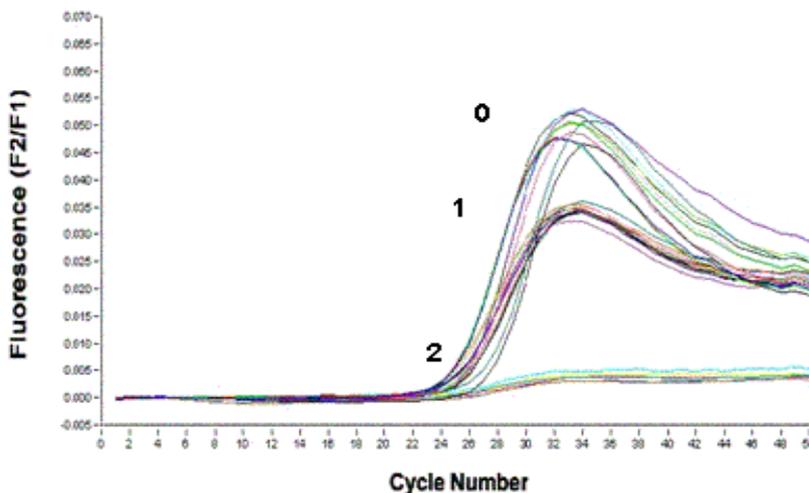


Abb. 3: hmg Gen Analyse. Unzuverlässige real-time PCR Signale bei „1“ und „2“, während Kurven „0“ normale Vervielfältigung zeigen.

Als wir die genaue Sequenz der hmg Zielregion in einigen dieser auffälligen Proben charakterisierten, wurde deutlich, dass an einzelnen Stellen eine andere Nukleinsäure vorlag (SNPs in Abb. 4) als die Originalsequenz (GenBank in Abb. 4) dies erforderte, damit die PCR Primer und Sonden (grau hinterlegte Bereiche) passgenau funktionieren würden.



Abb. 4: Sequenzpolymorphismen im hmg Gen.

Solche Einzelbasen Sequenzpolymorphismen (SNP), die in den hmg Genen einiger Proben angetroffen wurden, bildeten also vermutlich die Ursache für ein unzuverlässiges real-time PCR Signal. Darüber hinaus wurde klar, dass eine Zielsequenz mit nur einer veränderten Base (SNP) in einer Sondenbindungsstelle (rote Kreise in Abb. 4) zu einem zwar reduzierten real-time PCR Signal führte (#1 in Abb. 3), dabei aber immer noch einen Messwert erzeugte. Dagegen bewirkten zwei veränderte Basen, die gemeinsam in den jeweiligen Sondenbindungsstellen vorlagen (beide rote Kreise zusammen auf einem Genom), dass kein Messwert mehr erzeugt wurde (#2 in Abb. 3). Wir erkannten mit dieser Untersuchung also, dass Einzelbasen Sequenzpolymorphismen im Mais-spezifischen hmg Gen in einzelnen im Handel erhältlichen Pflanzenproben durchaus anzutreffen sind, und dass diese je nach Lage und Zahl, eine real-time PCR basierte Normierungsmessung beeinflussen können. Dies wiederum hätte einen Einfluss auf die Zuverlässigkeit einer damit verknüpften GVO Quantifizierung.

Wir haben deshalb auch die Zielsequenzen der anderen von uns verwendeten endogenen Mais Referenzgene genauer charakterisiert und waren nicht sonderlich erstaunt, auch dort Veränderungen in der Nukleinsäuresequenz zu finden.

Beim Invertase Gen fanden wir eine zusätzliche Gen Kopie, welche in allen untersuchten Proben vorkam, aber einige Sequenzpolymorphismen verglichen mit der ursprünglichen GenBank Sequenz aufweist. Wir konnten zeigen, dass diese Sequenzvariationen der zusätzlichen Invertase Gen Kopie derart waren, dass von dieser Kopie mit unserem real-time PCR System zwar eine PCR Vervielfältigung erwuchs (Primer konnten binden) aber kein Fluoreszenzsignal generiert wurde (Sonden binden nicht). Der Einfluss, den das Vorliegen dieser zusätzlichen Invertase Gen Variante auf die Invertase Normierungsmessung hat, ist nicht offensichtlich. Sicher ist allerdings, dass, abhängig davon, welches Invertase Normierungs PCR System von unterschiedlichen Laboratorien ver-

wendet wird, auch ein unterschiedlich starkes Signal erzeugt wird. Dies stört zwar den in einem Analyse Labor vollzogenen Normierungsschritt bei der GVO Quantifizierung nicht, es bedeutet aber, dass die Invertase Messungen von einzelnen Laboratorien, welche verschiedene PCR Systeme einsetzen, nicht zwingend miteinander verglichen werden können.

Bei genauerer Betrachtung der Zein Gen Vervielfältigung fanden wir, dass, ähnlich wie bei der hmg Analyse, einige Pflanzen Varietäten ein vermindertes real-time PCR Signal ergaben (Abb. 5).

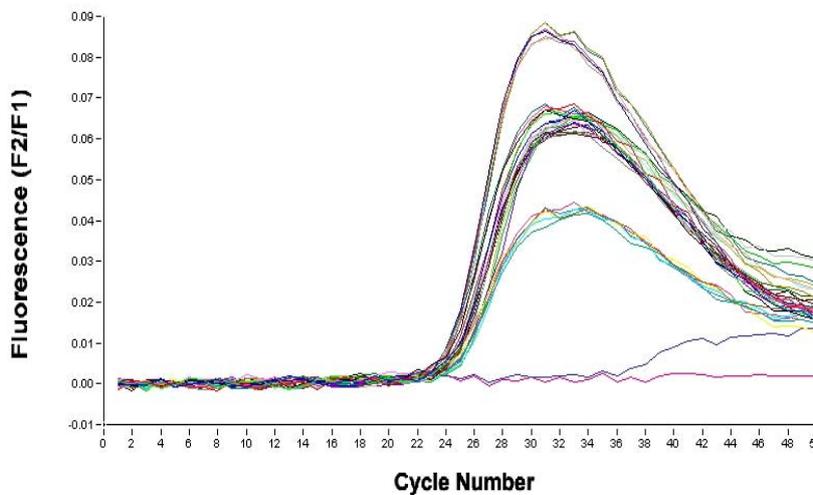


Abb. 5: Zein Gen Analyse. Unzuverlässige real-time PCR Signale in einigen Proben. Sequenzanalysen einiger repräsentativer Proben haben dann ergeben, dass in den Proben mit verminderten real-time PCR Signalen eine Nukleinsäure Variation (SNP) an einer bestimmten Position vorlag (roter Kreis in Abb. 6). Eine zusätzliche Probe zeigte darüber hinaus noch zusätzliche SNPs an diversen anderen Stellen innerhalb der Zein Zielsequenz (eingekreuzte Basen in Zeile SNP in Abb. 6).

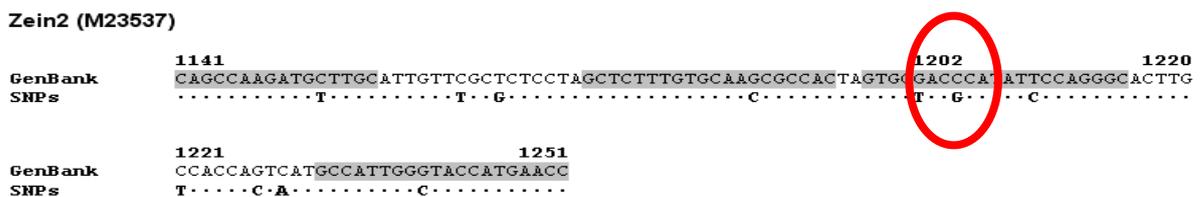


Abb.6: Sequenzpolymorphismen im zein Gen.

Neben diesen SNPs fanden wir in einigen Mais Varietäten zusätzlich noch eine 12 Nukleinsäure lange Deletion am 3'Ende des Zein Gens. Ein früheres real-time PCR System, dessen eine Sonde in dieser Deletion zu liegen kam, lieferte in 8 von 29 untersuchten Proben ein unzuverlässiges real-time PCR Signal. Im Zein Gen fanden wir also gleich mehrere Sequenzpolymorphismen, welche in verschiedenen Mais Varietäten unter-

schiedlich gehäuft auftraten. Den Einfluss, den diese einzelnen Polymorphismen auf die Zein Normierungsmessung haben, konnten wir nicht genauer abschätzen. Es ist aber aufgrund der beeinträchtigten Fluoreszenzsignale offensichtlich, dass eine gewisse Messvariabilität die Folge solcher Polymorphismen sein kann. Dies kann ebenso offensichtlich auch die GMO Quantifizierung basierend auf Zein gestützter Normierungsmessung beeinträchtigen.

Zusammenfassend können wir aus unserer Arbeit festhalten, dass Sequenzpolymorphismen in drei bekannten Referenzgenen des Mais (*ivr*, *zein* und *hmg*) weitaus häufiger vorkommen und vielfältiger ausfallen, als dies bis anhin angenommen wurde. Daraus ergibt sich für die GVO Quantifizierung, dass verstärkt Sorgfalt bei der Auswahl der real-time PCR Systeme und der Interpretation ihrer Resultate geübt werden muss, um vergleichbare Resultate bei der Anwendung unterschiedlicher Nachweissysteme zu erhalten.

Nachweis von gentechnisch veränderten Hefen im Rahmen der Weinbereitung

Christian von Wallbrunn, Manfred Großmann

Fachgebiet Mikrobiologie und Biochemie, Forschungsanstalt Geisenheim,
Von-Lade-Str. 1; 65366 Geisenheim

Der Einsatz von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) hat weltweit in der grünen Biotechnologie in den letzten Jahren einen immer größeren Stellenwert erreicht und zu einer intensiven Erforschung von möglichen Risiken und Auswirkungen geführt. Über die Verbreitung und Wirkung gentechnisch veränderter Mikroorganismen auf die Umwelt, vor allem in den Bereichen Bier- und Weinbereitung, ist aber bislang nur wenig bekannt.

Andererseits wird auf dem Feld der Hefen seit Jahrzehnten intensiv geforscht. Neben *Escherichia coli* ist *Saccharomyces cerevisiae* sicherlich einer der am besten charakterisierten Modellorganismen und es steht nahezu das komplette Methodenspektrum des Life-Science-Bereiches zur Verfügung.



Abb 1: Bestellung einer Flasche Wein in der Zukunft?

Auch in den Bereichen der Bier- und Weinproduktion werden Eigenschaften erforscht und es gibt zahlreiche Ansätze Hefen mit veränderten Produkteigenschaften mit Hilfe

der Gentechnik zu schaffen. Intensiv werden Gebiete bearbeitet, die Gäreigenschaften, das Aroma, die Most- und Wein-Behandlung, sowie die Weinqualität beeinflussen oder einen gesundheitlichen Vorteil bringen. Könnte es in Zukunft bei der Bestellung eines Weines aussehen, wie in Abbildung 1 dargestellt?

Durch Verstärkung verschiedener Enzymaktivitäten durch gentechnische Manipulation lassen sich Gärbuketts, Sortenaroma und Geschmack positiv verändern. Auch die Verringerung oder Vermeidung von Weinfehlern, wie den Bockser, durch Ausschaltung bestimmter Enzyme ist vorstellbar. Die Erhöhung bestimmter Enzymaktivitäten von Pektinasen, Proteasen und Glucanasen führt zu einer verbesserten Prozessierung im Rahmen der Weinbereitung, da schwierige Filtrationen entfallen und/oder der Einsatz von Hilfsstoffen wie Bentonit reduziert werden können. Ein weiteres Forschungsziel sind Hefestämme, die durch Stressresistenz oder veränderte Zucker- und Stickstoffverwertung verbesserte Gäreigenschaften haben.

Auf den Punkt gebracht sind die Verbesserung der Gäreigenschaften, Prozesssteuerung, Weinqualität und des Weinaromas die zukünftigen Einsatzbereiche gentechnisch modifizierter Weinhefen. Zahlreiche Publikationen befassen sich mittlerweile mit der Klonierung und Testung solcher gentechnisch veränderter Hefen zur Weinproduktion.

Zur Erkennung möglicher Risiken bei der Freisetzung von gentechnisch veränderten Mikroorganismen ist eine entsprechende Risikoforschung in praxisnahen, aber doch sicheren Simulationen notwendig. Nur mit der Kenntnis möglicher Risiken ist eine für die Zulassung erforderliche Sicherheitsbewertung möglich. Zur sachgerechten Bewertung möglicher Risiken durch Freisetzung gentechnisch veränderter Mikroorganismen ist eine Betrachtung des jeweiligen Einzelfalls unabdingbar.

In Geisenheim wird seit 1999 eine entsprechende Risikoforschung in gentechnischen Anlagen durchgeführt, die eine Simulation der Prozesskette der Weinbereitung ermöglicht. Von 2003-2007 wurde diese Forschung in einem Projekt zur „Bewertung des Einsatzes gentechnisch veränderter Mikroorganismen in der Weinbereitung“ durch das BMELV gefördert. Ziel war es, das Verhalten von ausgesuchten Modellhefen in Testsystemen realitätsnah zu untersuchen und einen Methodenkatalog zum Nachweis gentechnisch veränderter Hefen in verschiedenen Umweltsituationen zu entwickeln. Dabei wurde die gesamte Kette der Weinbereitung vom Weinberg über die Kellerei bis hin zum fertigen Wein, den Abfällen und dem Abwasser betrachtet (Abb.2).

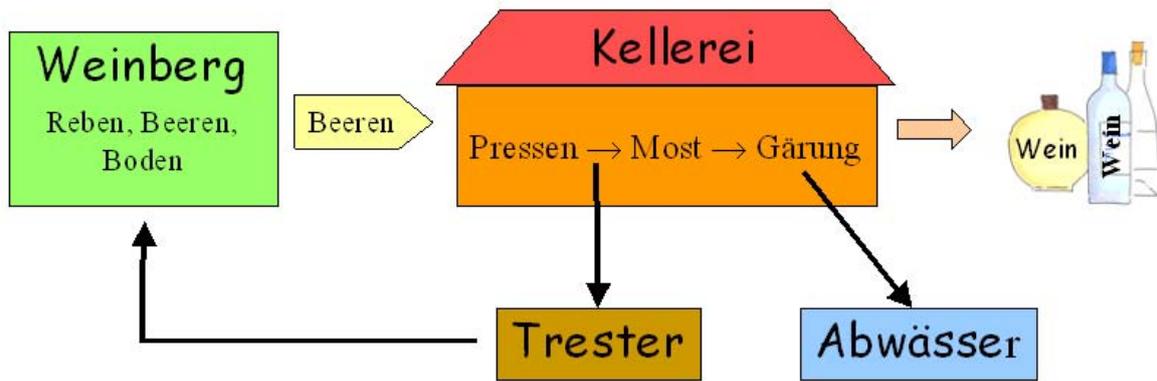


Abb.2: Im Rahmen des BMELV-Projektes "Bewertung des Einsatzes gentechnisch veränderter Mikroorganismen bei der Weinbereitung" zu untersuchende Gebiete der Weinbereitung.

Untersuchungen mit gentechnisch veränderten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen zur Freisetzung, Beprobung und zum Nachweis erfolgten in einem S1-Gewächshaus, sowie einem S1-Labor der Forschungsanstalt Geisenheim. In diesen Einrichtungen konnten Simulationen in entsprechend kleineren Maßstäben sowie Anreicherungen für folgende Nachweisreaktionen realisiert werden.

Als Modellorganismen wurden verschiedene Hefestämme verwendet, die auf *S. cerevisiae* VIN13, einer aus Südafrika stammenden, kommerziell erhältlichen Hefe zur Produktion von Wein zurückgehen. Der Stamm GMY1 verfügt über eine zusätzliche α -Amylase aus der Hefe *Lipomyces kononenkoe* unter der Kontrolle des *PGK1*-Promotors und Terminators, während der Stamm GMY2 eine endo-1,4-Glucanase aus dem Bakterium *Butyrivibrio fibrisolvens* und eine endo- β -Xylanase aus dem Schimmelpilz *Aspergillus niger* unter Kontrolle des *ADH1*-Promotors und Terminators enthält.

Der Nachweis gentechnisch veränderter Hefestämme erfolgte durch Einsatz auf den Phänotyp bzw. auf den Genotyp abzielender Methoden. Phänotypische Methoden beruhen auf dem Nachweis des veränderten Genproduktes bzw. dessen physiologischer Aktivität mit dem Nachteil, dass ein Phänotyp unter bestimmten Bedingungen nicht zwingend ausgeprägt sein muss. Im Gegensatz dazu ist der Genotyp nach einer gentechnischen Modifikation solange er anwesend ist auch nachweisbar. Bei bekannter DNA-Sequenz kann ein qualitativer Nachweis leicht durch Verwendung spezifischer Primer in einer PCR erfolgen (wie derzeit auch üblich). So lässt sich beispielsweise der Stamm GMY1 phänotypisch durch Klärhofbildung in einem Plattentest auf Phadebas-Medium bzw. genotypisch durch die Bildung eines ca. 1500 bp großen, spezifischen PCR-Produktes nachweisen. Die beiden sowohl genotypisch wie auch phänotypisch

nachweisbaren Hefestämme wurden in einem, in vier Parzellen eingeteiltes S1-Gewächshaus freigesetzt. Jede Parzelle war mit 20 getopften *Vitis vinifera* „Riesling“-Stöcken bestückt und konnte durch Vorhänge abgetrennt werden, um so bei der Freisetzung weitestgehend Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden in den Parzellen jeweils 1,5 l entsprechender Hefekulturen mit einer Zelldichte von $2,0 \cdot 10^6$ KBE/ml ausgebracht. Dabei handelte es sich um unnatürlich große Mengen, die freigesetzt wurden und eher einem „worst case“-Szenario entsprechen. Mit dem so behandelten Material wurden verschiedenste Fragestellungen bearbeitet. Es konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung der gentechnisch veränderten Hefen keinen Einfluss auf die natürlicherweise, durch die Reben ins Gewächshaus eingebrachte Hefeflora hatte. Auch hatten die freigesetzten, gentechnisch veränderten Hefen keine Auswirkungen auf Spontangärungen, die mit aus dem S1-Gewächshaus stammendem Traubenmaterial durchgeführt wurden. In Kleinversuchen konnte gezeigt werden, dass es bei der alkoholischen Gärung mit den Trauben aus den behandelten Parzellen keine Abweichungen zu den Kontrollen gab.

Im Bereich Kellertechnik wurde untersucht, ob es Unterschiede in der kontrollierten, alkoholischen Gärung zwischen Weinhefen und abgeleiteten, gentechnisch veränderten Hefestämmen gab. Dazu wurden jeweils 5 Liter Most mit gleichen Zellkonzentrationen von *S. cerevisiae* VIN13 und der abgeleiteten Hefe VIN13 *Ika1* angeimpft und vergoren. Weder im Verlauf der Gärung, noch in analytischen Untersuchungen mit GC-MS und Messung der Säuren mit der HPLC in vergorenem Wein waren Unterschiede erkennbar (Abb. 3).

An dieser Stelle sei auf die Bedeutung von Fallstudien hingewiesen! Der im vorgenannten Beispiel verwendete, gentechnisch veränderte Hefestamm unterschied sich nur durch die Anwesenheit einer zusätzlichen α -Amylase vom Ausgangsstamm. Die dadurch veränderte Möglichkeit der Zuckerverwertung dieses Stammes hatte in diesem Fall keinen Einfluss auf das Weinaroma. Dies würde sich beispielsweise bei Einsatz einer Hefe mit einer erhöhten Esterase-Aktivität ändern. Unterschiede in der Aroma-Analytik wären messbar. Auch ist ein unterschiedliches Verhalten modifizierter Hefestämmen bezüglich der Fähigkeit in der Umwelt zu überleben vorstellbar.

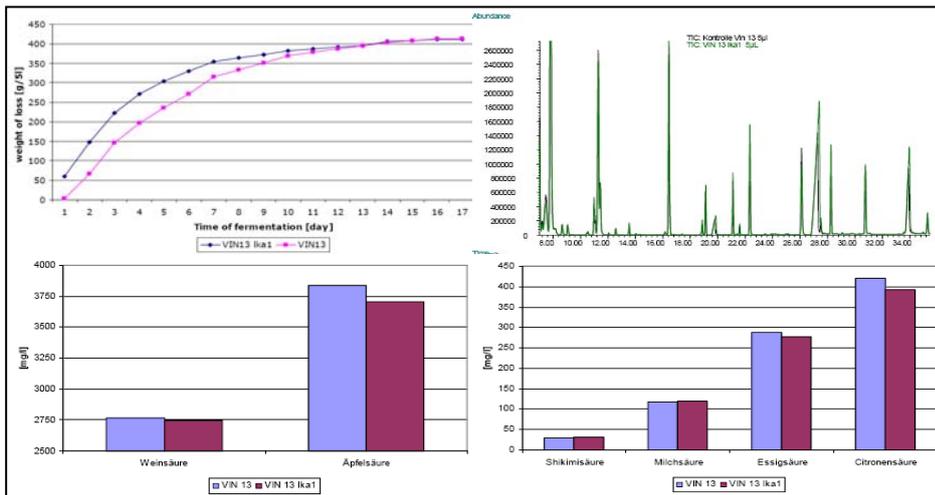


Abb.3: Verlauf der Gärung bei gezielter Animpfung *S.c.* VIN13 versus GMY1. Analytik des entstehenden Weines mit GCMS und HPLC

Seit 2003 hat sich die Situation bzgl. gv-Hefen konkret verändert, da zu diesem Zeitpunkt in den USA eine erste gentechnisch veränderte Hefe zur Weinherstellung zugelassen wurde und kommerziell durch die Firma Lesaffre/Springer unter der Bezeichnung ML01 vertrieben wird. Dieser Hefestamm ist in der Lage, parallel zur alkoholischen Gärung eine malolaktische Vergärung durchzuführen. Dabei handelt es sich um die, üblicherweise mit Milchsäurebakterien durchgeführte Umsetzung von Malat zu Laktat. Zu diesem Zweck wurde im Genom der Hefe eine Malat-Permease aus der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* und das Malolaktat-Enzym aus dem Bakterium *Oenococcus oeni*, jeweils unter der Kontrolle des PGK1-Promotors und Terminators, integriert. Die Integration dieser Genkassette erfolgte, wie mittlerweile veröffentlicht, in den URA3-Locus von *S. cerevisiae* S92 (Husnik et al., 2006) (Abb. 4).

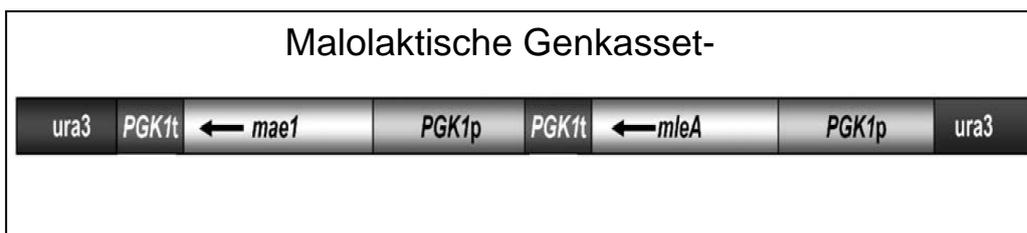


Abb.4: Anordnung der Gene in der Malolaktischen Genkassette des rekombinanten *S. cerevisiae*-Stammes ML01 (Husnik et al., 2006).

Dieser Hefe-Stamm ist in den USA „grass-accepted“ (GRAS Notice No. GRN 000120), mit der Konsequenz, dass dieser Stamm in den USA nicht als „gentechnisch verändert“ deklariert werden muss.

Die Veröffentlichung mit der genauen Darstellung der Genkassette und dem entsprechenden Integrationsort im Genom erfolgte erst, nachdem der Hefestamm kommerziali-

siert wurde und uns für Forschungszwecke vorlag. In der zunächst nur verfügbaren „Gras“-Notiz fanden sich keine detaillierten Beschreibungen zur Konstruktion des Hefestammes. Basierend auf diesen Informationen wurde in Geisenheim eine Nachweismethode mittels PCR entwickelt und in Freisetzungs- und Simulationsexperimenten weinbaulicher Tätigkeiten erfolgreich überprüft.

Hieraus wird die Problematik der Nachweisbarkeit von gentechnisch veränderten Organismen erkennbar, die vorliegt, wenn keine präzisen Informationen über mögliche Marker-Gene, verwendete Promotoren, Integrationsorte im Genom, usw., vorliegen.

Hier muss an praktikablen Lösungen wie Zentralregistern und einem weltweiten Informationsaustausch der Kontroll- und Zulassungsbehörden gearbeitet werden.

Insbesondere vor dem Hintergrund, dass in Zukunft weltweit mit dem Einsatz gentechnisch veränderter Mikroorganismen auch außerhalb geschlossener Systeme gerechnet werden muss.

Derzeit ist die zur Weinbereitung verwendbare Hefe ML01 in den USA, Moldawien und Kanada zugelassen und zumindest in Südafrika wurde eine Zulassung beantragt. Weiterhin ist eine weitere, gentechnisch veränderte Hefe für die Weinbereitung in den USA und Kanada unter der Bezeichnung EcMo01 zugelassen.

Bis zum Herbst 2007 lagen zumindest keine Informationen über einen Antrag zur Zulassung einer Weinhefe bei einer der europäischen Zulassungsbehörden vor.

Mit diesem Hintergrund stellt sich die Frage nach der derzeitigen Situation in der EU.

Die Mitgliedsstaaten der EU haben in den neunziger Jahren ein Moratorium zur Freisetzung rekombinanter Mikroorganismen beschlossen. Dieses Moratorium galt zumindest bis 2005, hat zur Zeit aber wohl auch weiterhin Gültigkeit. Außer einiger eng begrenzter Freisetzungen zu Forschungszwecken wurden bisher keine gentechnisch veränderten Mikroorganismen außerhalb geschlossener S1-Anlagen eingesetzt.

Wie sieht aber die rechtliche Situation im Bereich des Weins nach Abschluss des bilateralen EU-USA-Abkommens zur Anerkennung oenologischer Verfahren aus?

Der Einsatz gentechnisch veränderter Hefen ist in den USA ein oenologisches Verfahren. Zudem sind auch, wie oben ausgeführt, zwei Stämme in anderen Ländern zugelassen. Dürfen so produzierte Weine in der EU ohne Deklaration verkauft werden?

Entsprechend der EU-Verordnungen, die in nationales Recht umgesetzt werden müssen, können diese Weine in der EU ohne Deklaration vermarktet werden. Aufgrund des 16. Erwägungsgrunds der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 gilt: Wird der gentechnisch

veränderte Mikroorganismus als Verarbeitungshilfsstoff verwendet, so fallen die aus einem solchen Produktionsprozess hervorgehenden Lebensmittel und Futtermittel nicht in den Geltungsbereich der Verordnung. Verarbeitungshilfsstoffe werden definiert als "Stoffe", die nicht selbst als Lebensmittelzutat verzehrt werden, jedoch bei der Verarbeitung von Rohstoffen, Lebensmitteln oder deren Zutaten aus technologischen Gründen während der Be- oder Verarbeitung verwendet werden und unbeabsichtigte, technisch unvermeidbare Rückstände oder Rückstandsderivate im Enderzeugnis hinterlassen können, unter der Bedingung, dass diese Rückstände gesundheitlich unbedenklich sind und sich technisch nicht auf das Enderzeugnis auswirken".

Der Einsatz dieser Hefen zur Weinbereitung in Europa ist aber verboten, da diese Hefestämme keine Zulassung für die EU besitzen.

Zusammengefasst lässt sich folgendes sagen: aufgrund bisheriger Erkenntnisse im Bereich der grünen Gentechnik und eigener Ergebnisse zur Freisetzung von rekombinanten Organismen sind vor einer Zulassung gut geplante Studien zur Risikobewertung durchzuführen. Untersuchungen potenzieller ökologischer Effekte beim Einsatz gentechnisch veränderter Mikroorganismen sind unerlässlich. Eigene Resultate belegen, dass Fallstudien zum Einsatz von GMOs, bedingt durch unterschiedliches Verhalten, notwendig sind. Die Schaffung von internationalen Zentralregistern in denen spezifische Nachweise verfügbar sind, ist essentiell für eine entsprechende amtliche Überwachung.

Nur wenn mit einer entsprechenden Transparenz die Risikofreiheit solcher Organismen aufgezeigt wird und die Öffentlichkeit sachlich richtig informiert wird, kann in Zukunft eine höhere Akzeptanz von GMOs in der Bevölkerung erreicht werden.

Literatur

Gundllapalli Moses SB, Coredo Otero RR, La Grange DC, van Rensburg P, Pretorius IS (2002) Different genetic backgrounds influence the secretory expression of the *LKA1*-encoded *Lipomyces kononenkoae* α -amylase in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 651: 651-656

Husnik JI, Volschenk H, Bauer J, Colavizza D, Luo Z, van Vuuren HJ (2006) Metabolic engineering of malolactic wine yeast. *Metab Eng.* 8(4): 315-323

Strauss MLA (2003) The transformation of wine yeasts with glucanase, xylanase and pectinase genes for improved clarification and filterability of wine. MSc Thesis, Stellenbosch University

Sicherheitsforschung bei gentechnisch veränderten Pflanzen

Annette Block, Ulrich Busch

**Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
85764 Oberschleißheim**

Einleitung

Seit in Kraft treten der Freisetzung-Richtlinie 2001/18/EG ist die Anzahl zugelassener gentechnisch veränderter Pflanzen (gv, GVP) stetig gestiegen. Bei der Beprobung und dem Nachweis von GVP in Saatgut, Lebens- und Futtermittelproben werden von den Laboratorien zum Teil unterschiedliche Verfahren und Methoden eingesetzt, die nicht immer zu den gleichen Messergebnissen führen. Zudem erfordert das sich stetig erweiternde GVP-Spektrum eine regelmäßige Neuentwicklung und Aktualisierung von Detektionsverfahren für eine effektive und zuverlässige Analytik.

In dem Projekt 'Sicherheitsforschung bei gentechnisch veränderten Pflanzen' werden in Kooperation des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) mit dem Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung des Wissenschaftszentrums Weihenstephan anhand der in Deutschland zum Anbau zugelassenen, insektenresistenten Maislinie MON810 potentielle Einflussfaktoren der Beprobungs- und Verarbeitungsstrategie sowie der Analysetechnik auf den bestimmten Transgenanteil von Maisproben identifiziert und bewertet.

Harmonisierung von Beprobungs- und Analysestrategien

Zur Bearbeitung der Projektschwerpunkte 'Harmonisierung von Beprobungs- und Analysestrategien' und 'Bestimmung des Einflusses des pflanzlichen Entwicklungsstadiums auf die GVP-Analytik' wurden gezielte Kreuzungen mit MON810 Maislinien und ihren konventionellen Ausgangslinien im Feldversuch und im Gewächshaus durchgeführt. Während des Reifeprozesses der Maispflanze verschieben sich der Metabolismus und die Massenverhältnisse von vegetativem zu generativem Gewebe ebenso, sowie im Korn von Endosperm, Embryo und Pericarp. Diese Veränderungen können einen Einfluss auf den Transgenanteil der beprobten Gewebe haben.

Gewächshausversuch

Der Schwerpunkt der Kreuzungen im Gewächshaus liegt auf der Untersuchung des Effektes verschiedener Samenfraktionen auf den Transgenanteil des Maiskorns. 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. Die MON810 Sorten wurden geselbstet bzw. mit ihren konventionellen Ausgangssorten gekreuzt. Zudem erfolgten Kreuzungen zwischen den Linien der Züchter. Mit dieser Strategie können auch Variationen zwischen den Sorten erkannt werden.

Durch die hemizygote Situation der verwendeten MON810-Linien bzgl. des Bt-Gens existiert je ein homologes Chromosom mit und eines ohne Bt-Gen (vgl. Abbildung 1). Der Embryo kann folgende Genotypen haben: ein homologes Chromosom mit und eines ohne Bt-Gen (50% transgen), zwei Bt-Gene (100% transgen) kein Bt-Gen (0% transgen). Der Samen enthält jedoch verschiedene Gewebe (vgl. Tabelle 1). Neben dem Embryo sind vor allem das diploide Perikarp und das tri- bzw. hexaploide Endosperm (di- bzw. tetraploide Sorten) zu nennen. Da die mütterliche Linie die genetische Situation des Perikarps komplett und die des Endosperms zu zwei Drittel bestimmt, zeigen Samen von gentechnisch veränderten Mutterlinien einen höheren Transgenanteil als Samen von gv Vaterlinien. Die Samen einer gv Mutterlinie sind selbst dann transgen wenn sowohl Embryo als auch Endosperm konventionell sind, wegen ihres transgenen Perikarps.

Tabelle 1: Transgenanteile des Maiskorns abgeleitet entsprechend der Massenanteile der Gewebe nach Papazova et al. (2005)

Mutter GVO 50%	Embryo 5%	Perikarp 6%	Endosperm 89%	Samen 100%
GVO x Konv.	50%	50%	66%	64%
Konv x GVO	50%	50%	33%	35%
GVO x GVO	100%	50%	100%	97%
Konv x Konv.	0%	50%	0%	3%
Mutter GVO 100%	Embryo 5%	Perikarp 6%	Endosperm 89%	Samen 100%
GVO x Konv.	50%	100%	66%	67%
GVO x GVO	100%	100%	100%	100%
Mutter GVO 0%	Embryo 5%	Perikarp 6%	Endosperm 89%	Samen 100%
Konv x GVO	50%	0%	33%	32%
Konv x Konv.	0%	0%	0%	0%

Wesentlich für den Transgenanteil des Maiskorns ist somit seine Zusammensetzung aus den verschiedenen Gewebekompartimenten. Hierzu wurden in der Literatur verschiedene Angaben gemacht (Kruse 2002; Lambert, Alexander und Han 1998; López 2002; Papazova et al. 2005; Styer und Cantliffe 1984; Trifa und Zhang 2004). Die Berechnung des Transgenanteils aufgrund der Masse der Gewebefractionen des Maiskorns erfolgt nach einer Formel von Holst-Jensen, Loose und Eede (2006).

Es ist jedoch bekannt, dass nicht nur die Massenanteile der Samengewebe den Transgenanteil des Korns bestimmen (Papazova et al. 2005), sondern auch Faktoren wie die Feinheit der Mehlfraktionen seiner Kompartimente bei der Vermahlung, die Effektivität der DNA-Extraktion aufgrund verschiedener Inhaltsstoffe sowie die Menge der Zellen und ihr Ploidiestatus in den einzelnen Geweben (Kowles und Phillips 1995; Schweizer et al. 1995). Zudem wurde eine Abhängigkeit dieser Faktoren von der Sorte beschrieben (Trifa und Zhang 2004). Die Aussagen der Wissenschaftler variieren jedoch stark bezüglich der Gewichtung dieser Faktoren und den hieraus abgeleiteten Transgenanteilen im Maiskorn, so dass dieser Sachverhalt noch nicht abschließend geklärt ist.

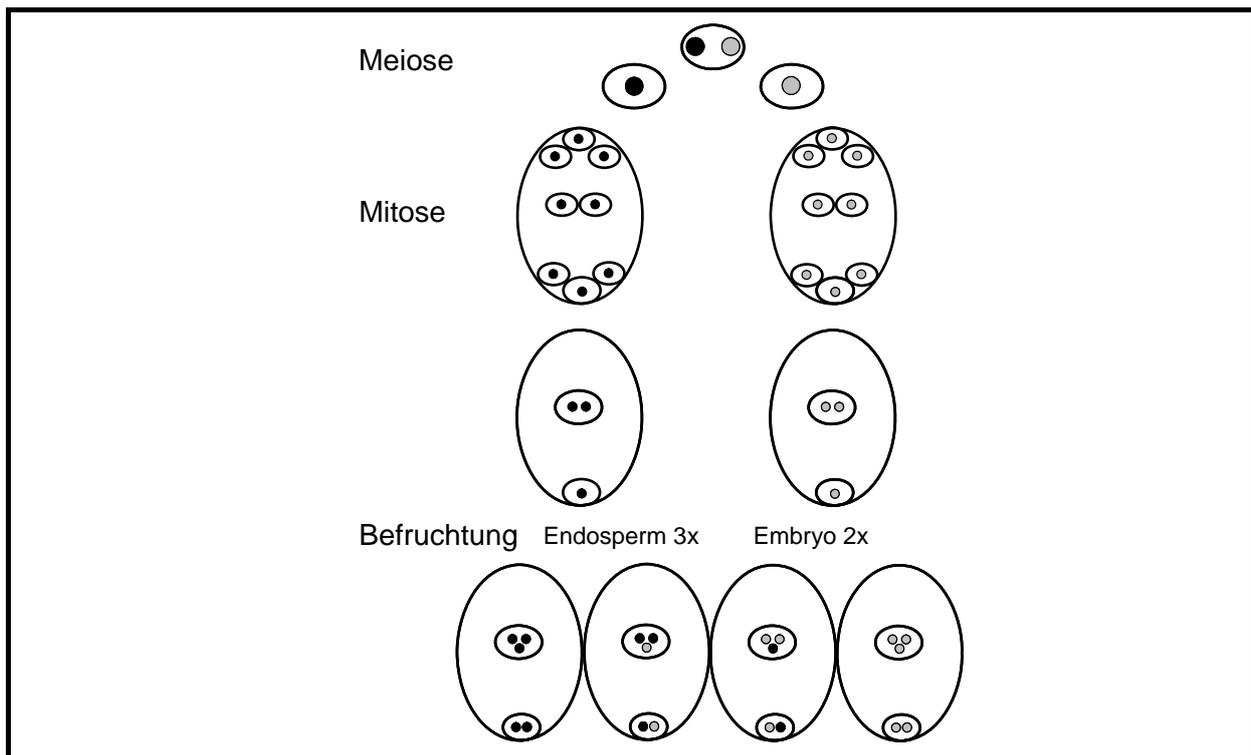


Abbildung 1: Genetische Situation von Embryo und Endosperm bei Selbstungen hemizygoter GVP
 schwarz: Chromosomen mit Bt-Gen; grau: Chromosomen ohne Transformation; Meiose: homologe Chromosomen trennen sich (zwei von vier haploiden [1C] Zellen dargestellt). Mitotische Teilungen: entstehen von acht 1C Zellkernen, zwei verschmelzen zur Embryomutterzelle (2C), fünf zu Synergiden bzw. Antipoden (1C), die meisten degenerieren. Doppelte Befruchtung: der Embryo wird diploid (2C), das Endosperm triploid (3C).

Probenanalyse

Voruntersuchungen zur Bestimmung des Transgenanteils von Einzelkörnern aus Kreuzungen ergaben, dass die GVP-Anteile nicht den Erwartungen entsprachen.

Tabelle 2: Quantifizierte Transgenanteile von Einzelkornanalysen via plasmidaler Kalibrierstandards

♀ Mutter	Genotyp der Gonaden				
	50% GVP Soll-GVP	♀ GVP x 97%	♀ GVP x 64%	♀ Konv. x 35%	♀ Konv. x 3%
1	-	-	-	-	-
2		82%		56%	
3					9,5%
4		78%			
5				58%	
6			71%		
7					8,8%
8					9,0%
9			70%		
10			69%		
11			62%		
12			70%		
13					8,0%
14			67%		
15					5,4%
16					8,9%
17		75%			
18					6,3%
19		78%			
20				57%	
Mittelwert	78%	68%	57%	8,0%	

Abkürzung: Konv. = Konventionelle Pflanze ohne Transformation

Bei der Methodvalidierung stellte sich heraus, dass weder die Kalibrierstandards aus Mais Kornmehl (CRM, Fluka), noch kommerziell erworbene Plasmidstandards gute Wiederfindungsraten (Tabelle 2) zeigen. Für Folgeanalysen werden daher genomische Standards aus homozygotem MON810 Material verwendet.

Freilandversuch

Ziel der Kreuzungsversuche im Freiland ist, mittels verschiedener Transgenanteile im Korn die Auswirkungen praxisrelevanter Erntestrategien auf die GVP Anteile zu untersuchen. In der Landwirtschaft existieren je nach Verwendung des Mais verschiedene Erntemethoden, denen durch angepasste Beprobungsstrategien entsprochen wurde. Sie wirken sich auf Erntezeitpunkt und verwendetes Pflanzengewebe aus. Silomais wird in der Regel als erstes geerntet, gefolgt von Lieschkolben und Körnermais. Für die Rinderfütterung wird die komplette Pflanze als Silomais genutzt. Lieschkolben, die in der Schweinefütterung eingesetzt werden, enthalten Kolben inklusive Spindeln und Lieschblätter. Beim Körnermais gehen ausschließlich Körner in die Verarbeitung ein. 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' (♀ x ♂) gekreuzt. Die Probenahme erfolgte an sechs Terminen, in einem Zeitraum von Mitte September bis Ende Oktober 2007 (vgl. Tabelle 3). Dabei ändert sich der Metabolismus in den Kompartimenten des Korns ebenso wie in der gesamten Maispflanze und vegetative Pflanzenteile beginnen abzusterben (BBCH 87-90). Pro Termin und Kreuzungsschema wurden zehn Pflanzen beprobt. Da Kreuzungen in der Regel keinen 100% Kreuzungserfolg zeigen, wurden zur Normierung der Gewichtsverhältnisse zudem je zehn Referenzpflanzen der Sorten 'Kuratus' und 'Gavott' beerntet. Auf maschinelle Verarbeitung wurde aufgrund der Verschleppungsgefahr von transgenem Material weitestgehend verzichtet.

Tabelle 3: Beprobungsschema und Probenumfang im Freilandversuch

Variabeln	Woche						Summe
	38.	39.	40.	41.	42.	43.	
Woche							6
Kreuzungspflanzen	2x 10	2x 60					
Referenzpflanzen	2x 10	2x 60					
Σ	40	40	40	40	40	40	240

Die Effekte dieser Faktoren auf den Transgenanteil in Korn- u. Pflanzengewebe, werden untersucht indem die entsprechenden Gewebe getrennt verarbeitet werden. Mit einem Event spezifischen 'real time PCR' Assay (ISO 21570) wird von jeder Probe der Transgenanteil von zehn Einzelkörnern, gepoolten Körner eines Kolbens, von Lieschkolben, vegetativem Pflanzenmaterial und der kompletten Pflanze bestimmt.

QPCR-Methodenvalidierung

Zur Untersuchung potentieller Ursachen nicht exakter GVP Quantifizierungen, wurde eine Validierung der verwendeten Kalibrierstandards vorgenommen. Genomische Kalibrierstandards bekannter Kopienzahl wurden mit Hilfe kommerziell bezogener Plasmidstandards rückquantifiziert. Entsprechend der ISO 21570 wurde für die 'real time PCR' Quantifizierung ein Event spezifische Assay (AF434709, Holck et al. 2002) in Kombination mit einem PCR Assay für das *hmga* 'house keeping' Maisreferenzgenen (AJ131373, Hernández et al. 2004) verwendet.

Tabelle 4: Abweichungen bestimmter Transgenanteile mit Hilfe plasmidaler Standards

Soll: genomische Kalibrierreihe			Ist: plasmidale Kalibrierreihe		
Referenz Genkopien	MON810 Genkopien	GVO-Anteil	Referenz Genkopien	MON810 Genkopien	GVO-Anteil
136	68	50%	52	33	64%
542	271	50%	211	114	54%
2.170	1.085	50%	887	419	47%
8.680	4.340	50%	3.623	1.549	43%
34.718	17.359	50%	14.961	4.553	30%

Wie anhand von Tabelle 4 zu erkennen ist, zeigen die Abweichungen des quantifizierten Transgenanteils im Verhältnis zum tatsächlichen eine Tendenz auf. Bei einer Kopienzahl von 250–1000 MON810 und 500–2000 *hmga* Sequenzen ist die relative Quantifizierung (%) via plasmidaler Kalibrierstandards präzise. Bei sinkender bzw. steigender Kopienzahl wird der Transgenanteil dagegen überschätzt bzw. unterschätzt (vgl. Abbildung 2). Dies deutet auf einen systematischen Fehler der plasmidalen Quantifizie-

rungsstandards hin. Zudem werden sowohl die hmg- als auch die MON810 Sequenzen von den plasmidalen Standards um ca. die Hälfte unterschätzt.

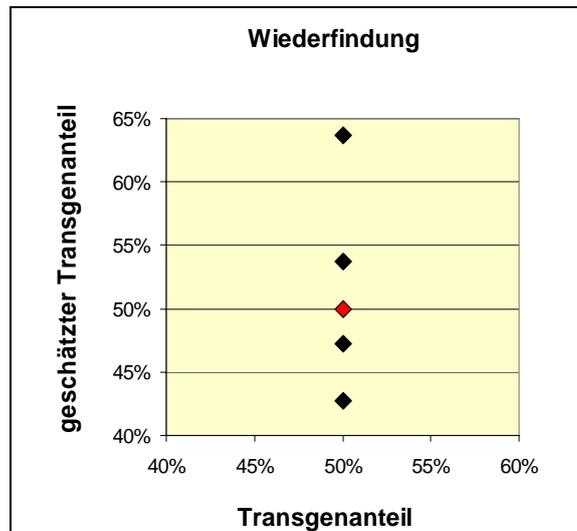


Abbildung 2: Wiederfindungsrate transgener Proben mit Hilfe plasmidaler Kalibrierstandards

Ausblick

Entwicklung und Validierung von DNA-Kalibrierstandards

Ein wesentlicher Schwerpunkt der GVP Analytik liegt in der Optimierung von quantitativen Bestimmungen des Transgenanteil pflanzlicher Proben. Da in der 'real-time PCR' mit den Datenpunkten der Standards die Kalibrierfunktion abgeleitet wird, kommt der Wahl der Standards eine entscheidende Bedeutung zu.

Das häufig als Standard verwendete kommerzielle 'certified reference material' (CRM) besteht aus einer Kornmehlmischung von kommerziellen und gv Samen. Für CRM sind einige Nachteile bekannt. Die wichtigsten sind, dass es nur für bestimmte GVP, in wenigen GVP-Konzentration verfügbar (0,1–5 %) ist. Da aktuelle EU-Bestimmungen die Berechnung des Transgenanteils via Genkopien fordern (2004/787/EG), werden verstärkt 'künstliche' DNA-Kalibrierstandards entwickelt.

Plasmidale GVP Standards der 'ersten Generation' weisen z.T. entscheidende Nachteile auf. Häufig liegen gv DNA-Kopien und Taxon spezifische Genkopien nicht auf demselben Plasmid, was aufgrund von Stabilitätsunterschieden zu Differenzen in der PCR-Effizienz und somit zu Quantifizierungsfehlern führen kann. Hinzu kommt, dass ein zunehmender Bedarf an Event spezifischen DNA-Kalibrierstandards (Plasmide, Hybridmo-

leküle) besteht, die auch bei Insertion mehrerer Konstrukte in einer GVP (z.B.: Bt11), sowie gestaffelten Genkonstrukten aufgrund von Kreuzungsvorgängen zu sicheren und eindeutigen GVP Quantifizierungen führen.

Aufgrund dieser Problematik sollen für die GVP Analyse 'künstliche' DNA-Kalibrierstandards entwickelt werden, die Taxon- und Event spezifische Sequenzen auf dem selben DNA-Molekül tragen. Die erstellten DNA-Kalibrierstandards werden hinsichtlich ihrer Robustheit, Empfindlichkeit und der Erzeugung reproduzierbarer Quantifizierungen in der 'real-time PCR' validiert.

Aktuelle Nachweisverfahren

Aufgrund der stetig steigenden Anzahl neu entwickelter GVP besteht ein dringender Bedarf an Detektionsmethoden, die einen hohen Parallelisierungsgrad erlauben. Eine relativ neue, PCR basierende Methode, sind LPA Assays (Ligation Dependent Probe Amplification). Diese viel versprechende Methode wurde bereits im Lebensmittelbereich, darunter auch in der GVP Analytik erfolgreich (Ehlert et al. 2007; Moreano et al. 2004) eingesetzt.

Das besondere Prinzip der LPA liegt darin, dass für jede Ziel-DNA zwei Hemisonden verwendet werden, deren zielequenzspezifischen Hybridisierungsbereiche von universellen Primerbindungsstellen flankiert sind (Abbildung 3). Während dem ersten Reaktionsschritt, der Hybridisierung, legieren beide Sonden an die Ziel-DNA. Im Anschluss daran folgt eine PCR-Amplifikation der kompletten Ligationssonden mit Hilfe der komplementären Universalprimer. Die PCR-Fragmente verschiedener Zielgene können über eine Größenfragmentierung via Gelelektrophorese detektiert werden. Zur Erleichterung der Differenzierung werden zwischen den Hybridisierungs- und den Primerbindungsbereichen entsprechend lange 'Spacer' eingeführt.

Der Vorteil der LPA-Technik liegt in der simultanen Amplifikation mehrerer Zielsequenzen mit Hilfe derselben Universalprimer, so dass im Gegensatz zu anderen Multiplex-PCR Ansätzen keine Konkurrenz um Reagenzien auftritt. Durch die Multigen Detektion, die hohe Spezifität und Sensivität und die einfache Erweiterbarkeit hat die LPA- Methode viele Vorteile für die GVP-Analytik.

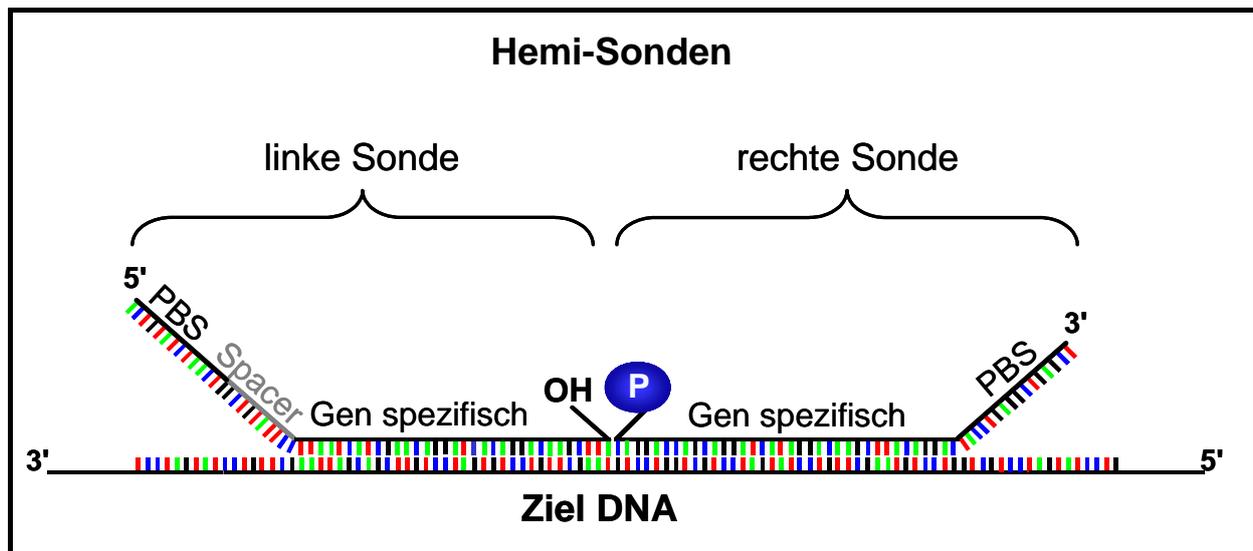


Abbildung 3: Schema der Funktion von LPA-Hemisonden
Abkürzung: PBS = Primer binding site, Primerbindungsstelle

Danksagung

- Dieses Projekt wird finanziert vom Bayerischen Staatsministeriums für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz
- Das Projekt wird in Kooperation mit dem Institut für Pflanzenzüchtung, TUM Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Frau Prof. Dr. Schön durchgeführt
- Die Feldversuche fanden auf Agrarflächen und in Gewächshäusern des Bayerischen Landesamt für Landwirtschaft (LfL) in Freising unter Betreuung von Herrn Dr. Joachim Eder und Herrn Dr. Martin Müller statt
- Die Vermahlung von Probenmaterial wurde mit der freundlichen Unterstützung von Herrn Dr. Dieter Nast am LfL Freising, Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen, vorgenommen

Literaturverzeichnis

- Ehlert A., F. Moreano, U. Busch und K.-H. Engel. 2007. Development of a modular system for detection of genetically modified organisms in food based on ligation-dependent probe amplification. *European Food Research and Technology* DOI 10.1007/s00217-007-0790-x.
- Hernández M., M.-N. Duplan, G. Berthier, N. Vaïtilingom, W. Hauser, R. Freyer, M. Pla und Y. Bertheau. 2004. Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *zea mays* L. *Agriculture and food chemistry* 52: 4632-4637.
- Holck A., M. Vaïtilingom, L. Didierjean und 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 A., M. de Loose und G. 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.
- Kowles R.V und R. L. Phillips. 1995. DNA amplification patterns in maize endosperm development nuclei during kernel development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7010-7014.
- Kruse M. 2002. GVO-Verunreinigungen in konventionellem Saatgut: Schwellenwerte, Nachweisverfahren, Ergebnisse. *Forschungsschwerpunkt Biotechnologie und Pflanzenzüchtung* 8. Kolloquium.
- Lambert R. J., D. E. Alexander und Z. J. Han. 1998. A high oil pollinator enhancement of kernel oil and effects on grain yields of maize hybrids. *Agronomy Journal* 90: 211-215.
- López M. R. F. 2002. El Cultivo del maíz en Guatemala. *Internet*:1-45.
- Moreano F., A. Ehlert, U. Busch und K.-H. Engel. 2004. Ligation-dependent probe amplification for the simultaneous event-specific detection and relative quantification of DNA from different genetically modified organisms.
- Papazova N., A. Malef, A. Degrieck, I.E. Van Bockstaile und 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.
- Schweizer L., G. L. Yerk-Davis, R.L. Phillips, F. Srienc und R.J. Jones. 1995. Dynamics of maize endosperm development and DNA endoreduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7070-7074.
- Styer R. C. und D. J. Cantliffe. 1984. Dependence of seed vigor during germination on carbohydrate source in endosperm mutants of maize. *Plant Physiol* 76: 196-200.
- Trifa, Y. und D. Zhang. 2004. DNA content of embryo and endosperm in maize kernel (*Zea mays*): Impact on GMO quantification. *Journal of Agricultural and food chemistry* 52: 1044-1048.

Rückverfolgbarkeit von gentechnisch veränderten Rapsorten mit Hilfe von SNP-Biochips

Peter Westermeier

**Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, Technische Universität München
Am Hochanger 2, D-85350 Freising**

Mit der Verabschiedung der Novelle des deutschen Gentechnik-Gesetzes am 21.12.2004 durch den deutschen Bundestag wurden die Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG, die EU-Verordnungen (EG) Nr. 1829/2003, (EG) Nr. 1830/2003 über die Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) sowie die Empfehlung 2003/556/EG zur Koexistenz in nationales Recht umgesetzt. So soll ein Landwirt, der gentechnisch veränderte Pflanzen (GVP) nutzt, für dadurch entstehende Einkommenseinbußen des Nachbarn haften, auch wenn die GVO-Gehalte unter dem Schwellenwert von 0,9 % zur Kennzeichnungspflicht liegen. Ist kein Verursacher einer transgenen Auskreuzung zu ermitteln, haften alle in Frage kommenden GVO-anwendenden Landwirte gesamtschuldnerisch für den durch den GVO-Anbau entstandenen finanziellen Schaden. Aufgrund der restriktiven Haftungsregelungen sowie der in der Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG geforderten Rückverfolgbarkeit transgener Organismen wird die Feststellung von Quellen gentechnischer Beimengungen besonderes Interesse erlangen. Derzeit erfolgt eine Rückverfolgungsanalyse gentechnischer Beimengungen größtenteils auf der Basis des spezifischen PCR-Nachweises von transgenen Kontrollelementen und Strukturgenen (siehe Abbildung 1). Durch eine geeignete Kombination einzelner Analysen ist daher in gewissem Maße eine Rückverfolgbarkeit gegeben.

Bezeichnung der gentechnisch veränderten Linie	Name	Unternehmen	Screening-Tests				Konstruktsspezifische Nachweise			
			p35S	pActin	T-nos	nptII	p35S-pat	pFMV-EPSPS	p35S-nptII	pSSUAra-bar
23-198, 2318-17, pCGN3828-212/86-16, pCGN3828-212/86-23	Laurical	Calgene	x			x				
Falcon GS40/90		AgrEvo, Aventis	x			x				
GT200 (RT200)	Roundup Ready	Monsanto					x			
GT73, RT73	Roundup Ready	Monsanto					x			
HCN10	Independence, LibertyLink	AgrEvo, Aventis	x			x				
HCN92 (Topas 19/2)	Innovator, LibertyLink	AgrEvo, Aventis	x			x				
Liberator L62 (pHoe6/Ac)		AgrEvo, Aventis	x			x				
MPS961, 962, 963, 964, 965	Phytaseed	BASF							x	
MS1xRF1 (PGS1)	InVigor, SeedLink	Plant Genetics Systems			x	x			x	
MS1xRF2 (PGS2)	InVigor, SeedLink	Plant Genetics Systems			x	x			x	
MS8, RF3, MS8xRF3	InVigor, SeedLink	Plant Genetics Systems			x				x	
OXY235	Westar	Rhone Poulenc								
PHY23		Plant Genetics Systems	x		x				x	
PHY14, PHY35, PHY36		Plant Genetics Systems			x				x	
T45 (HCN28)	Excel, LibertyLink	AgrEvo, Aventis	x							

Abbildung 1: Derzeitiger Nachweis transgener Pflanzen (nach Egert et al. 2006)

Wie jedoch an den farbigen gekennzeichneten positiven Analysen für die jeweiligen Konstrukte in Abbildung 1 zu erkennen ist, sind mit diesem System nicht alle Transformationsereignisse zu erfassen bzw. einige Transformationsereignisse sind nicht eindeutig voneinander unterscheidbar. Dieses Problem ist durch die Entwicklung von sog. eventspezifischen Nachweisverfahren zu lösen, bei dem anhand der Übergangsregion zwischen der DNA des Zielorganismus und dem transgenen Konstrukt ein definiertes Transformationsereignis detektiert wird. In der Praxis sind solche Nachweise nicht für alle Transformationsereignisse verfügbar, da die Insertionsstelle in der DNA des Zielorganismus zunächst unbekannt ist und häufig mehr als eine Kopie eines transgenen Konstrukts ins Genom eingebaut sind.

Bei einer kommerziellen Nutzung von GVP ist zudem zu erwarten, dass dieselben Konstrukte in unterschiedlichen Sortenhintergründen oder als Kreuzungspartner in Hybridzuchtprogrammen eingesetzt werden. Abbildung 2 zeigt ein mögliches Szenario beim Anbau von transgenem Raps. Mit den derzeit gängigen Methoden ist zwar eine Auskreuzung von GT73-Raps von den GS40/90-Sorten in den konventionellen Raps zu unterscheiden, aber eine Differenzierung zwischen einer Auskreuzung der Sorten Modul^{LL} GS40/90 und Avalon^{LL} GS40/90 in den konventionellen Raps ist nicht möglich.

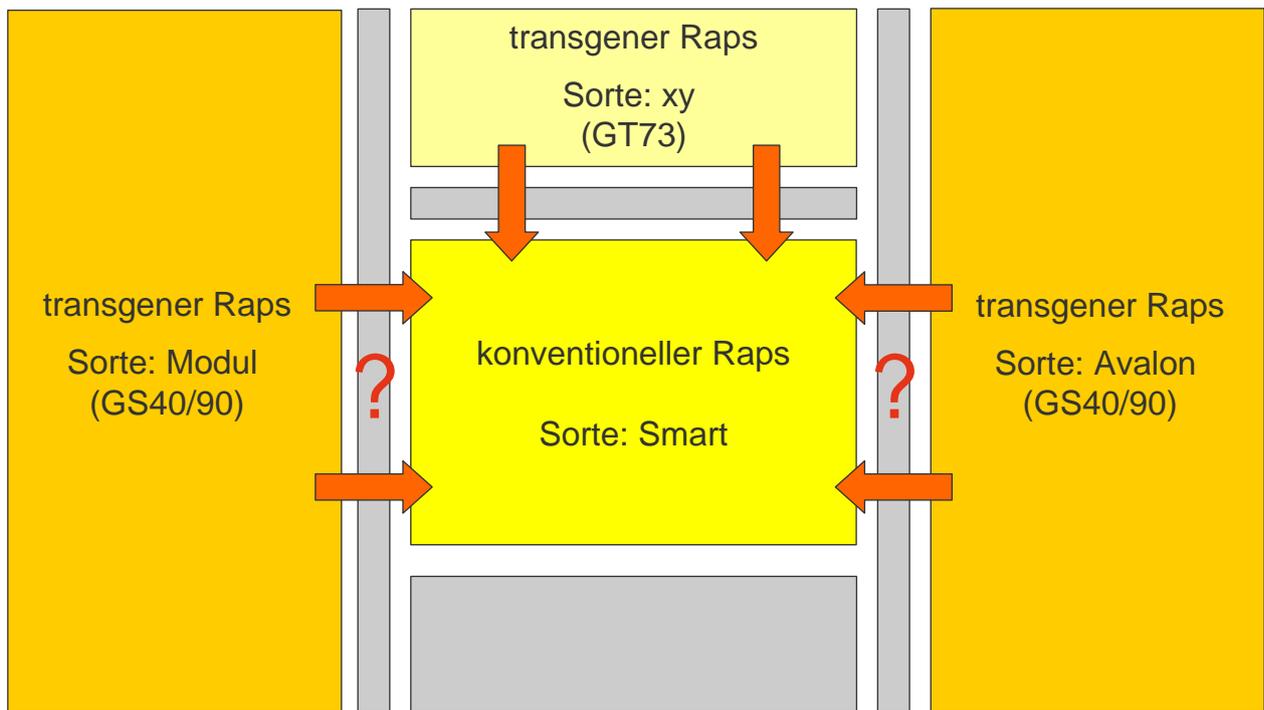


Abbildung 2: mögliches Szenario des Anbaus von transgenem Raps

Daher sind Modul^{LL} und Avalon^{LL} auch mit einem eventspezifischen Nachweisverfahren nicht voneinander zu unterscheiden. Künftig wird es notwendig sein, zusätzlich zur Bestimmung der transgenen Veränderung einen Nachweis der Sorte, in die das transgene Konstrukt eingebracht wurde, durchzuführen, um eine eindeutige Rückverfolgung sicherstellen zu können.

Zu diesem Zweck wurden im Rahmen des vorgestellten Projekts DNA-Marker zur Sortendifferenzierung entwickelt und in deutschen Rapsorten evaluiert. Sortenspezifische Punktmutationen ('Single Nucleotide Polymorphisms'; SNPs) besitzen eine Reihe von Eigenschaften, die sie als DNA-Marker besonders geeignet erscheinen lassen. Sie kommen in großer Häufigkeit in Genomen vor und sind dabei relativ gleichmäßig im Genom verteilt. Außerdem werden SNP-Marker codominant vererbt, was eine einfache Detektion heterozygoter Allelzustände erlaubt. SNP-Marker treten in der Regel nur in 2 Ausprägungen auf, daher ist deren Auswertung verglichen mit multiallelen Markersystemen eindeutiger und damit deren Detektion und Auswertung gut automatisierbar. Abbildung 3 zeigt einen Sequenzausschnitt aus zwei Rapsorten mit insgesamt 8 Sequenzpolymorphismen zwischen zwei Raps- Genotypen. Zum Sortennachweis wird pro Fragment eine Punktmutation herangezogen, da in der Regel je Fragment zwei SNP-Haplotypen vorliegen und eine Analyse weiterer Punktmutationen aus diesem Fragment keinen Informationsgewinn liefern würde.

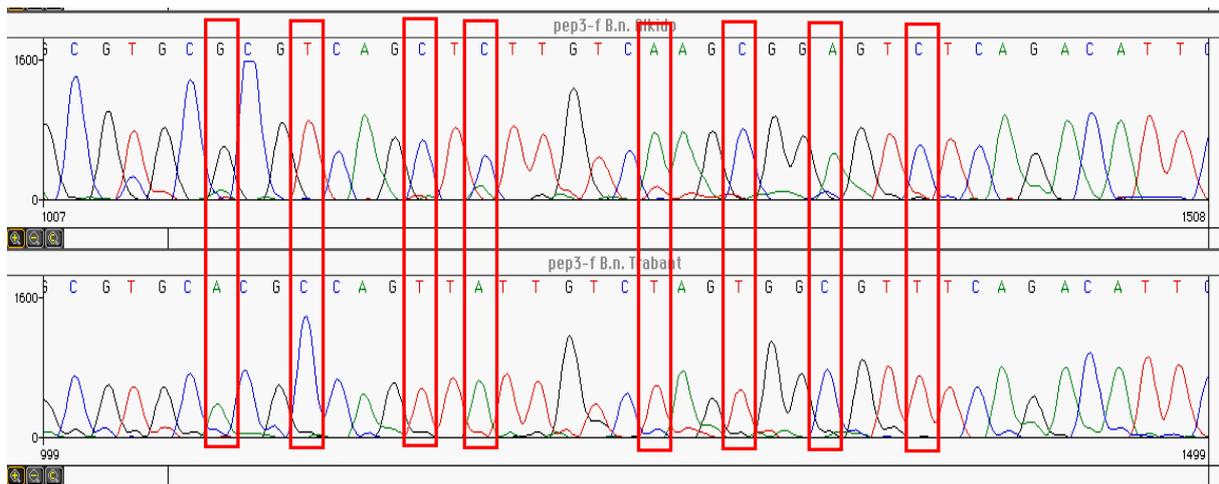


Abbildung 3: Sequenzabgleich von zwei Sorten mit insgesamt 8 Punktmutationen

Bei der Aufdeckung von SNP-Markern in der Kulturart Raps ergaben sich aufgrund der komplizierten Genomstruktur Hindernisse die in zahlreichen Genduplikationen begründet sind. Raps (*Brassica napus* L.) ist aus einer Hybridisierung der beiden Arten *Brassica rapa* L. (Rübsen) und *Brassica oleracea* L. (Gemüsekohl) hervorgegangen (U 1935). Dieses Ereignis fand vor ca. 10.000 Jahren statt (Rana *et al.* 2004). Daher ist für viele Gene mit dem Auftreten von Allelen in duplizierter Form zu rechnen. Bei der Untersuchung der Evolutionsgeschichte der *Brassicaceen* konnten Rana *et al.* (2004) feststellen, dass der Genus *Brassica* aus einer Genomtriplikation vor ca. 4 Mio. Jahren hervorgegangen ist (siehe Abbildung 4). Diese Triplikation wurde im Lauf der Evolution wieder auf eine zytologisch diploide Form zurückgeführt, dennoch haben sich aus den triploiden Vorfahren zahlreiche Gen-Triplikationen in den diploiden *Brassica*-Arten erhalten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass in dem, aus zwei diploiden *Brassica*-Genomen aufgebauten allotetraploiden Raps-Genom, bis zu sechs Kopien eines Gens vorkommen können. Parkin *et al.* (2005) konnten beispielsweise aus 21 Fragmenten des *Arabidopsis thaliana*-Genoms durch Duplikationen die Struktur des Raps-Genoms rekonstruieren. Dabei konnte die Mehrheit der *Arabidopsis thaliana*-Segmente jeweils sechs Segmenten im Raps-Genom zugeordnet werden. Da für das Auffinden von Punktmutationen singuläre Fragmente erforderlich waren, wurden für die Aufdeckung singulärer SNP-Zielsequenzen mehrere Selektionsschritte durchgeführt.

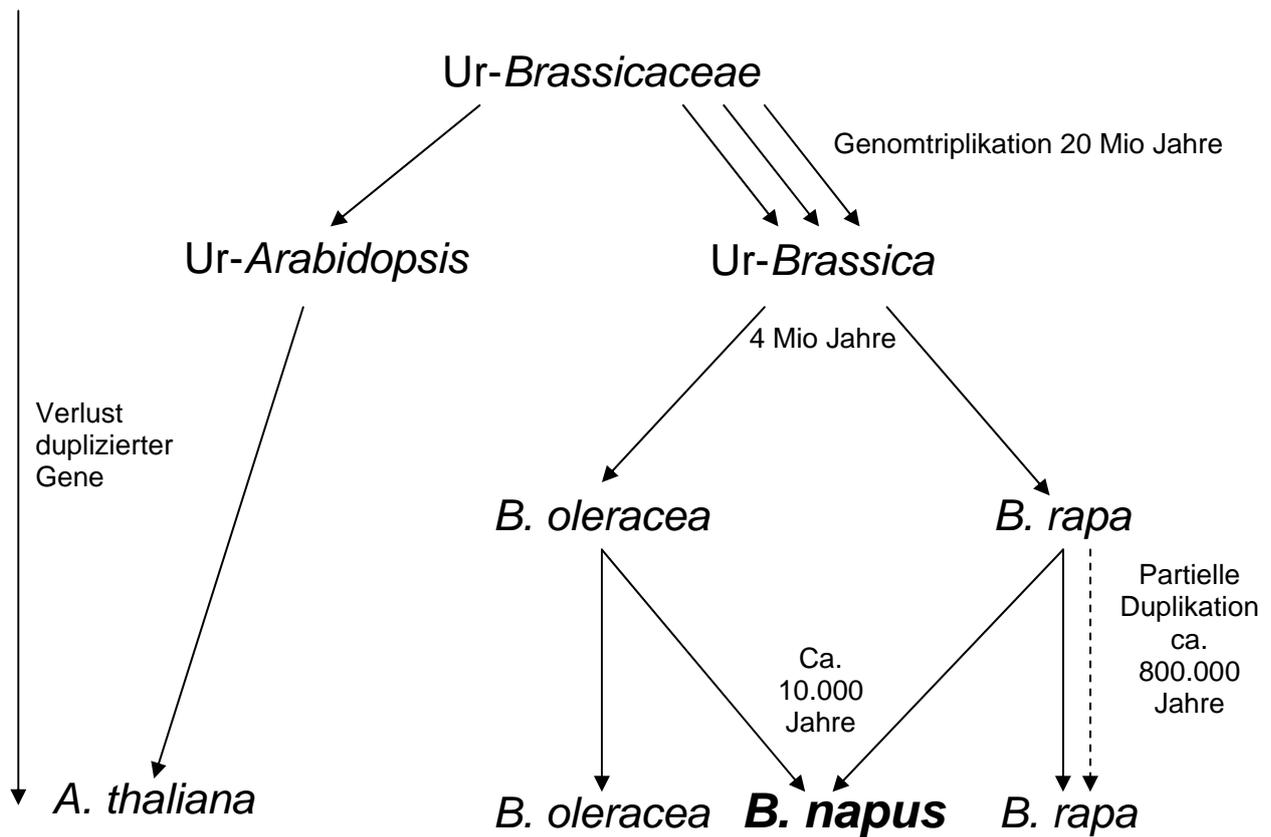


Abbildung 4: Evolution des *Brassica*-Genoms (nach Rana et al. 2004)

Insgesamt konnten auf diese Weise 16 sortendifferenzierende SNP-Marker und 3 InDel-Marker (Insertion / Deletion) in Raps aufgedeckt werden. Mit Hilfe der aufgedeckten Punktmutationen wurden unter Anwendung der Primer-Extension-Methode (Sokolov 1990; Ausubel et al. 1991) 80 konventionelle, deutsche Sorten und sechs transgene Sorten genotypisiert. Dabei wurde für jede der diagnostischen Punktmutationen ein spezielles Oligonukleotid entwickelt, das genau vor der zu detektierenden Punktmutation endet. In einer Minisequenzierreaktion wird dann das Oligonukleotid um das jeweils korrespondierende Fluoreszenzfarbstoff-markierte Didesoxynukleotid verlängert (Primer Extension) welches einen Abbruch der Kettenreaktion bewirkt und mit geeigneten Analysegeräten (z.B. DNA-Sequenziersystem) detektiert werden kann. Abbildung 5 zeigt das Prinzip der 'Primer-Extension'-Reaktion. Diese Methode ist sehr einfach in der Auswertung, da im Gegensatz zur vollständigen Sequenzanalyse nur die Base von Interesse detektiert wird.

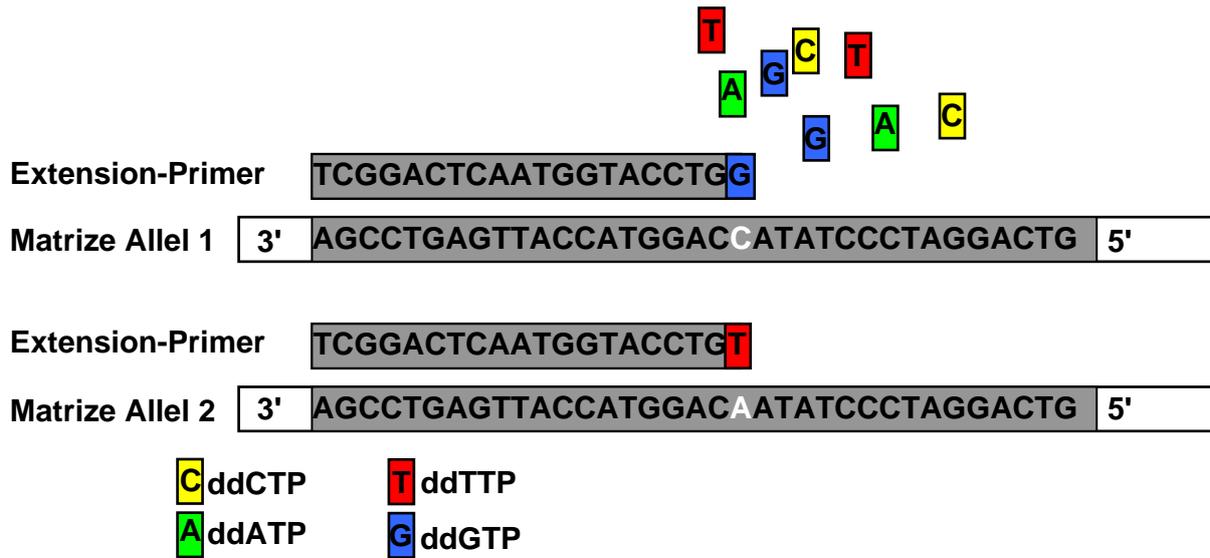


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Primer-Extension-Reaktion

Abbildung 6 a zeigt das Ergebnis der Analyse eines SNP-Markers in 16 Genotypen mit Hilfe des SNaPshot[®] Multiplex Kits (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die ersten 16 Farbsignale auf der linken Seite des Gelbildes zeigen die SNP-Detektion in der 5'-3'-DNA-Matrize, die 16 Farbsignale auf der rechten Seite des Gelbildes entstammen den gleichen Genotypen und sind im komplementären DNA-Strang analysiert worden. Diese Doppelbestimmung kann als interne Kontrolle der Genotypisierungsergebnisse genutzt werden. Abbildung 6 b zeigt die Auswertung der Farbsignale mit der Software GeneScan 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Außen sind die 2 jeweils homozygoten Allelzustände in beiden DNA-Strängen abgebildet, in der Mitte die beiden möglichen heterozygoten Allelzustände.

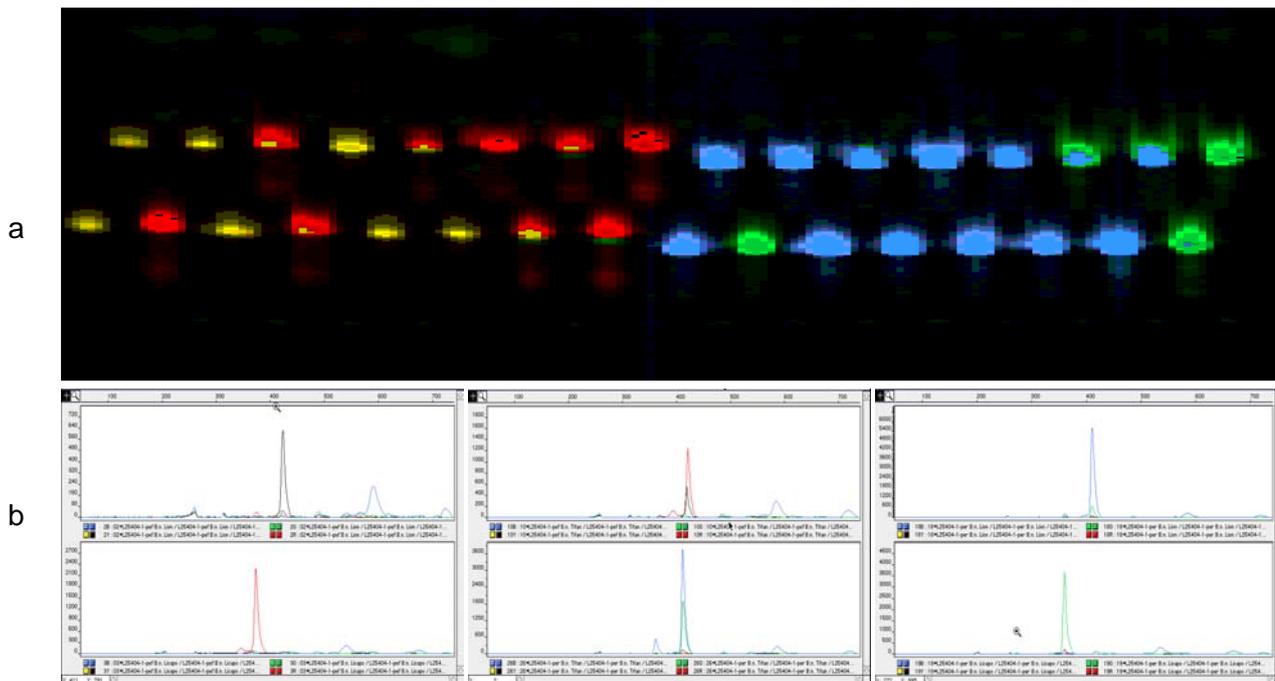


Abbildung 6: Detektion (a) und Auswertung (b) von gelbasierten Primer-Extension-Reaktionen

Von den 86 Sorten können mit dem vorliegenden Satz an SNP-Markern 84 (97,6 %) eindeutig bestimmt werden. Zu den unterscheidbaren Sorten zählen auch die in den Jahren 2005 und 2006 wirtschaftlich wichtigsten 10 Rapsorten in Bayern bzw. der Bundesrepublik Deutschland, lediglich 2 Sorten sind mit dem vorliegenden Satz an SNP-Markern nicht zu unterscheiden. In einer durchgeführten Clusteranalyse zeigte sich, dass die transgenen Sorten Modul^{LL} GS40/90 und Avalon^{LL} GS40/90 jeweils zusammen mit ihren isogenen Ausgangslinien ein Cluster bilden. Es zeigte sich aber auch, dass beide transgene Sorten nicht zu 100 % mit ihren isogenen Ausgangslinien übereinstimmen, sondern gewisse Abweichungen der Allele festzustellen sind. Um Sorten-, und GVO-Nachweis auf einer einheitlichen Analyseplattform durchführen zu können, wurden Nachweise der derzeit in Raps gebräuchlichen transgenen Konstrukte ebenfalls auf Primer-Extension-Basis etabliert. Die Entwicklung der GVO-Assays erfolgte in enger Anlehnung an die Vorgaben der offiziellen Nachweisverfahren. Nachweise wurden entwickelt für: '35S-Promotor', 'NOS-Terminator', 'nptII-Selektionsmarker', CRT (Nachweis von viraler CaMV-DNA zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse für 35S), *s_gt* und *pepC* (Nachweis genomischer Raps-DNA), '*pat*' (GS40/90), '*bar*' (MS8xRF3) und '*epsps*' (GT73). Um Beimengungen von transgenen Spuren anderer Kulturpflanzen detektieren zu können, wurden außerdem Nachweise für das Vorhandensein von Mais- bzw. Soja-DNA entwickelt.

In Kooperation mit der Firma Array-On GmbH, Gatersleben erfolgte der Transfer der Analysen auf BioChip-Ebene. Die Analyse erfolgt dabei über Arrayed Primer Extension (APEX) Reaktionen (Shumaker et al. 1996; Pastinen et al. 2000). Der Nachweis einer Punktmutation erfolgt dabei durch Verlängerung eines auf einer Glasoberfläche immobilisierten Oligonukleotids mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Nukleotiden. Analog zur herkömmlichen Primer Extension Methode endet das immobilisierte Oligonukleotid unmittelbar vor der zu detektierenden Punktmutation und wird entsprechend der Matrizen-DNA an der SNP-Stelle mit Hilfe einer speziellen DNA-Polymerase verlängert. Um bei der Detektion mit dem Laserscanner Störsignale durch nicht-inkorporierte Nukleotide zu minimieren, erfolgen nach der Reaktion verschiedene Waschschrirte. Abbildung 7 zeigt schematisch den Ablauf einer APEX-Analyse.

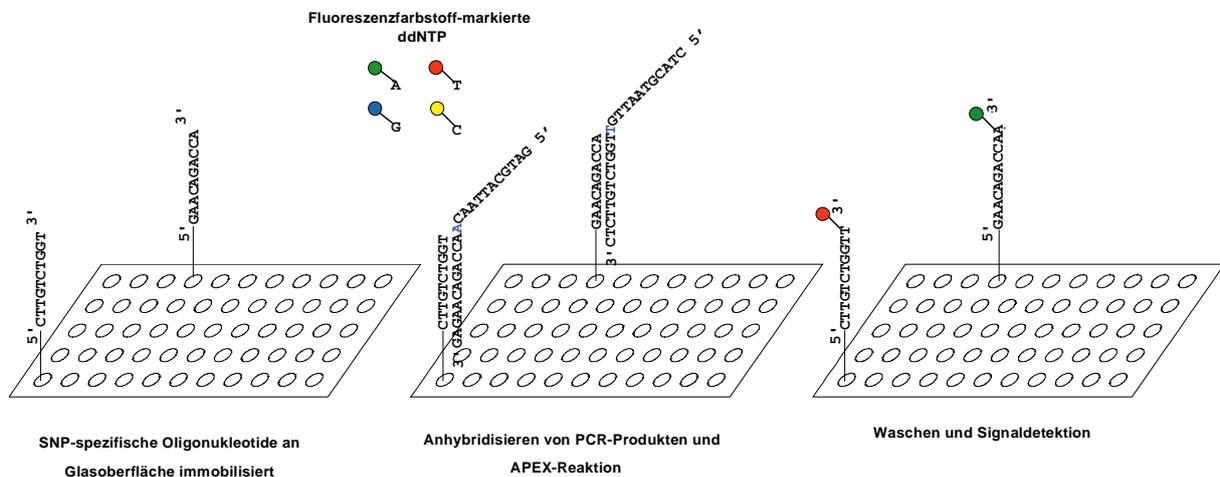


Abbildung 7: schematischer Ablauf einer APEX-Analyse

Während alle GVO-Nachweise auf den BioChip übertragen werden konnten, war dies aufgrund der bereits geschilderten, genombedingten Schwierigkeiten nur für 12 der 19 entwickelten SNP-Marker möglich. Damit können die 10 bayern- und bundesweit wirtschaftlich bedeutendsten Rapsorten (Anbaufläche >90 %) eindeutig bestimmt werden. Aufgrund des biallelen Charakters war es möglich, die Primer-Extension-Reaktionen in einem System zu etablieren, das mit zwei Fluoreszenzfarben (cy3 und cy5) arbeitet. Dies hat den Vorteil, dass für die Analysen statt eines 4-Farb-Laserscanners auch ein kostengünstigerer 2-Farb-Laserscanner verwendet werden kann. Nachteil dieser Methode ist eine etwas aufwändigere Durchführung der Analysen, da statt einer gemeinsamen Mischung aller vier möglichen Nukleotide mehrere Mischungen aus den für je-

den Marker zwei möglichen Nukleotiden, die jeweils verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffmarkiert sind, eingesetzt werden müssen. Dieser Unterschied betrifft jedoch nur die Durchführung der Analysen, nicht jedoch die Etablierung und Herstellung der BioChips. Es kann je nach vorhandener Laborausstattung ein 2-Farb- bzw. 4-Farbsystem eingesetzt werden.

Abbildung 8 zeigt beispielhaft die Untersuchung einer Rapsorte mit Hilfe eines SNP-BioChips. Der Ausschnitt zeigt den Analysepunkt eines einzelnen SNP-Markers. Dieser setzt sich aus $12 \times 12 = 144$ Einzelpunkten zusammen und ermöglicht so eine genaue und eindeutige Detektion der Farbsignale. Zusätzlich befinden sich auf dem BioChip außerdem je eine interne Extensionskontrolle für die vier möglichen Nukleotide Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin. Diese stellen eine Positivkontrolle der Primer-Extension-Reaktion für alle vier möglichen Nukleotide dar. Die in der Darstellung roten und grünen Felder stellen jeweils homozygote Allelzustände dar, eine gelbe Farbdarstellung ergibt sich aus der Farbüberlagerung von roten und grünen Farbsignalen und stellt einen heterozygoten Allelzustand dar (obere Reihe, 4. und 8. Feld von links).

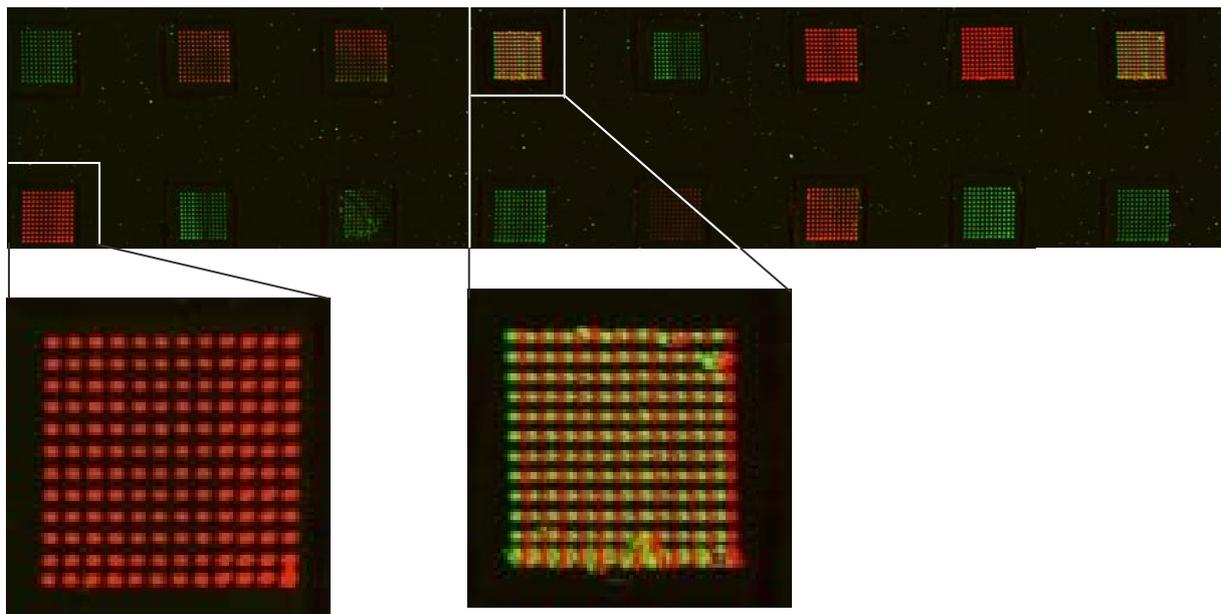


Abbildung 8: Untersuchung einer Rapsorte mit 12 SNP-Markern und 4 Reaktionskontrollen

Analog dem SNP-BioChip wurde ein Makroarray zum Nachweis transgener Strukturgene und Kontrollsequenzen in Raps entwickelt. Alle auf dem GVO-BioChip befindlichen Nachweisverfahren sind in Anlehnung an die offiziellen methodischen Vorgaben der Bund/Länderarbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG) bzw. anderen offiziellen Methoden

entwickelt worden. Dies gewährleistet eine größtmögliche Kompatibilität mit den derzeit von offiziellen Stellen verwendeten Nachweisverfahren.

Die Transgennachweise wurden mit Hilfe von DNA-Verdünnungsreihen (genomische GVO-DNA in einem Hintergrund von nicht-genomischer Raps-DNA) validiert. Dabei konnte eine Nachweisgrenze zwischen 0,05 % und 0,1 % ermittelt werden. Diese Zahlen wurden in PCR-Reaktionen ermittelt, die für jedes Fragment separat durchgeführt wurden. Die Detektion der PCR-Fragmente auf einem konventionellen Agarosegel erlaubt bei einem Transgenanteil von 0,05 % bzw. 0,1 % keine eindeutigen Aussagen. Hier ist also ein eindeutiger Gewinn in der Detektionsempfindlichkeit festzustellen. Abbildung 9 a zeigt systematisch den Aufbau des GVO-BioChips sowie die Lage der einzelnen Analysepunkte. Zusätzlich zur Positivkontrolle auf das Vorhandensein von Raps-DNA (Glu, bzw. s_{gt}) wurden Nachweisverfahren für das Vorhandensein von Mais-(HMG) bzw. Soja-DNA (Lec) mit aufgenommen, um bei Untersuchungen zusätzliche Hinweise zu erhalten, ob eine transgene Verunreinigung möglicherweise aus Beimengungen von Stoffen anderer Kulturarten stammen könnte. Um falsch-positive Ergebnisse bezüglich des 35S-Promotors zu vermeiden, wurde eine Kontrollsequenz (CRT) hinzugenommen, die genomische DNA des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) anzeigen kann. Dieses Virus kann auch die Kulturpflanze Raps infizieren und führt dann zu falsch-positiven Ergebnissen bezüglich des 35S-Promotors, der im CaMV-Genom seinen Ursprung hat. Die Nachweise pat, EPS und bar beziehen sich auf transgene Strukturgene, die der Rapspflanze eine Toleranz gegen entsprechende Totalherbizide verleiht. TN5 ist ein Antibiotika-Selektionsmarker, der in der Vergangenheit häufig bei der Transformation von Pflanzen verwendet wurde, und tNOS ist ein in transgenen Konstrukten häufig verwendeter Terminator. Die 'NO-T-control' c1 (no-template-Kontrolle) beinhaltet Nachweise aller 10 Analysepunkte und zeigt daher eventuelle Verunreinigungen der PCR-Reaktionen für alle 10 Nachweispunkte an, die 'SE-X-control' c2 zeigt Primer-Extension-Reaktionen an, die in Abwesenheit von PCR-Fragmenten stattfinden. Diese können bei nicht-optimalen Reaktionsbedingungen, wie z.B. zu niedriger Temperatur oder der Ausbildung von Haarnadelstrukturen vorkommen. Die Analysepunkte c3 und c4 (AT, bzw. GC-control) sind positiv-Kontrollen für die Primer-Extension-Reaktionen.

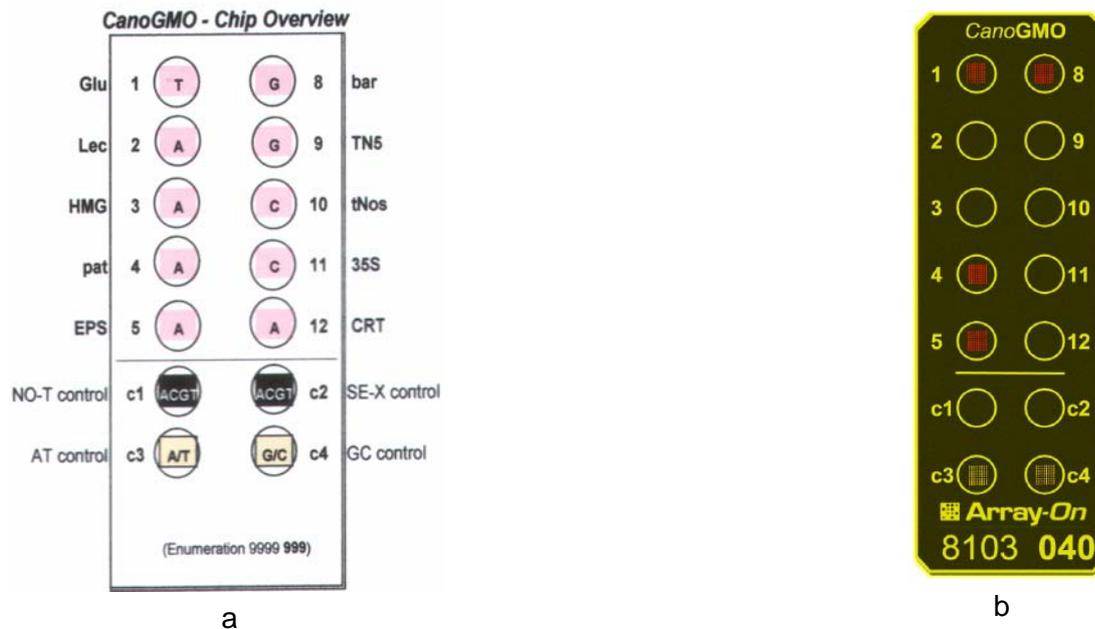


Abbildung 9: schematischer Aufbau des GVO-BioChips (a), sowie Analyse einer transgenen Mischprobe (b)

Zusätzlich wurden für den GVO-Nachweis Multiplex-PCR-Reaktionen entwickelt. Dies erlaubt die Reduktion der Reaktionsansätze von 10 auf 4. In Ansatz 1 konnten die Nachweise für *hmg* (Mais-DNA), CRT und *bar* zusammengefasst werden, in Ansatz 2 die Nachweise für *s_gt* (Raps-DNA), *nptII* und *epsps*, in Ansatz 3 die Nachweise für 35s und *pat*, sowie in Ansatz 4 die Nachweise für lectin (Soja-DNA) und *nos*-Terminator. Die Ansätze 1 und 4 sowie die Ansätze 2 und 3 können für die Analyse auf dem Chip jeweils vereinigt werden, so dass sich die Anzahl der auf dem Chip für eine Probe benötigten Areale von 14 auf 2 verringert. Die jeweiligen Positiv-Kontrollen sind dabei ebenfalls in den Multiplex-Arealen integriert und erscheinen grün (siehe Abbildung 10). Die Transgennachweise sind jeweils in Zeilen angeordnet. Jede Zeile entspricht dabei dem Nachweis eines Elements. Diese werden mit roten Nukleotiden markiert.

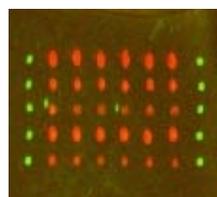


Abbildung 10: Areal des Multiplex-BioChips zum Transgennachweis

Literatur

Egert M, Hormisch D, Mäde D, Pecoraro S, Westphal K (2006) Konzept zur Analytik von gentechnisch veränderten Futtermitteln - erarbeitet vom Arbeitskreis PCR-Analytik des VDLUFA. Herausgeber: Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen (2. Auflage)

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA Struhl K, in: Current Protocols in Molecular Biology (New York: Greene Publishing Associates / Wiley Interscience, 1991)

Parkin IAP, Gulden SM, Sharpe AG, Lukens L, Trick M, Osborn TC, Lydiate DJ (2005) Segmental Structure of the *Brassica napus* Genome Based on Comparative Analysis With *Arabidopsis thaliana*. Genetics 171: 765-781

Pastinen T, Raitio M, Lindroos K, Tainola P, Peltonen L, Syvänen AC (2000) A System for Specific, High-throughput Genotyping by Allele-specific Primer Extension on Microarrays. Genome Res 10: 1031-1042

Rana D, van den Boogaart T, O'Neill CM, Hynes L, Bent E, Macpherson L, Park JY, Lim YP, Bancroft I (2004) Conservation of the microstructure of genome segments in *Brassica napus* and its diploid relatives. Plant J 40: 725-733

Shumaker JM, Metspalu A, Caskey CT (1996) Mutation Detection by Solid Phase Primer Extension. Hum Mutat 7: 346-354

Sokolov BP (1990) Primer extension technique for the detection of single nucleotide in genomic DNA. Nucleic Acids Res 18: 3671

U N (1935) Genome-analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. Jpn J Bot VII: 389-452

Alternative GVO-Nachweismethoden (Co-Extra)

Lillian Roth, Hermann Broll

**Bundesinstitut für Risikobewertung, Thielallee 88-92
14195 Berlin**

Zusammenfassung

Um die Rückverfolgbarkeit von genetisch veränderten Lebens- und Futtermitteln zu gewährleisten, werden geeignete Verfahren für den Nachweis und die Quantifizierung von genetisch veränderten Organismen (GVO) benötigt. Der direkte Nachweis der genetischen Veränderung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR), beziehungsweise Real-Time PCR für die quantitative Analyse, stellt derzeit den bevorzugten Ansatz für die Kontrolle dar. Die PCR ist für Routineanalysen geeignet; allerdings muss für jede Probe beziehungsweise jede genetische Veränderung (GVO-*event*) eine separate Reaktion durchgeführt werden, so dass bei hohem Probenaufkommen der Arbeits-, Zeit- und Kostenaufwand signifikant ansteigt. Der gleichzeitige PCR-Nachweis mehrerer GVOs in einer Reaktion (Multiplex-PCR) ist problematisch und bestenfalls auf einige wenige Zielsequenzen begrenzt anwendbar. Insofern stellt die separate, individuelle Amplifikation in der PCR bei umfangreichen Untersuchungen den „Flaschenhals“ in der Analytik dar.

Durch die Aufhebung des *de facto* Zulassungsmoratoriums in der EU von 1998 ist die Anzahl von GVO auf dem Europäischen Markt sprunghaft gestiegen und wird in Zukunft voraussichtlich weiter zunehmen. Folglich wird der Bedarf an Deklarationskontrollen im Umfang steigen. Zusätzlich muss die Einfuhr von nicht in der EU zugelassenen GVO durch internationalen Handel überwacht werden. Für die Kennzeichnungskontrolle sind deshalb anpassungsfähige Standardmethoden erforderlich, die einen hohen Proben-durchlauf ermöglichen und gleichzeitig den Zeit- und Kostenaufwand niedrig halten.

Im Rahmen des EU-Forschungsprojektes Co-Extra (*GM and non-GM Supply Chains: Their Co-Existence and Traceability*; 6. Forschungsrahmenprogramm der EU) werden Alternativmethoden zur PCR mit den Schwerpunkten *multiplexing* und Array-Technologie erarbeitet. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) als Mit-Initiator nimmt an dem Projekt mit dem Ziel teil, eine neue Nachweismethode für den parallelen,

spezifischen Nachweis vieler unterschiedlicher GVO in einem gemeinsamen Versuchsansatz zu entwickeln.

Das Verfahren basiert auf der Gesamtgenomamplifikation mittels *Multiple Displacement Amplification* (MDA). Durch eine isotherme Vervielfältigung der vorhandenen Proben-DNA wird eine ausreichende Menge DNA zur Verfügung gestellt, um eine anschließende Detektion GVO-spezifischer Sequenzen durch Hybridisierung an immobilisierte Fangsonden zu ermöglichen. Zusätzlich wird am BfR ein methodischer Ansatz getestet, um durch eine Kombination von komplementärer Sondenhybridisierung, immunologischer Detektion und einer einheitlichen PCR eine Signalverstärkung für den parallelen Nachweis verschiedener spezifischer Sequenzen in genomischer DNA beziehungsweise in mittels MDA vervielfältigter DNA zu ermöglichen. Das Prinzip basiert auf der *Real-Time Immuno-PCR*, einer Methode aus dem Gebiet der Proteinanalytik, die für die ultrasensitive Detektion von Proteinen eingesetzt wird.

Einleitung

Nationale und europäische Umfragen wie beispielsweise das Eurobarometer [1] haben gezeigt, dass nach wie vor viele europäische Verbraucher eine grundlegend ablehnende Haltung gegenüber GVO einnehmen und dass ein starkes Interesse an der Wahlfreiheit der Verbraucher, gewährleistet durch zuverlässige Kennzeichnung, besteht. Die in der Richtlinie 2001/18/EG [2] und den Verordnungen (EG) 178/2002 [3], (EG) 1829/2003 [4] und (EG) 1830/2003 [5] festgelegten Regelungen sollen die transparente Koexistenz und Rückverfolgbarkeit von genetisch veränderten (gv) und konventionellen Produkten entlang der Warenkette sichern. Sie legen unter anderem fest, dass Lebens- und Futtermittel, die aus GVO bestehen, diese enthalten oder daraus hergestellt sind, gekennzeichnet sein müssen. Nur wenn der GVO-Gehalt nicht größer als 0,9 % und zufällig oder technisch unvermeidbar ist, entfällt die Kennzeichnungspflicht. Für nicht für den Europäischen Markt zugelassene GVO gilt die Nulltoleranz, d.h. bereits der Nachweis kleinster Mengen genügt, um das Produkt vom Markt zu entfernen. Für die Kontrolle der korrekten Kennzeichnung und Überwachung der Präsenz nicht zugelassener GVO sind geeignete Nachweissysteme erforderlich, die eine Identifizierung und Quantifizierung von GVO ermöglichen.

Genetisch veränderte Organismen (GVO) können in Lebens- oder Futtermitteln prinzipiell anhand der neu integrierten DNA-Sequenz, der daraus transkribierten mRNA oder

des resultierenden Proteins beziehungsweise Metabolits oder Phänotyps nachgewiesen werden. Während der Nachweis vieler Metaboliten, beispielsweise Fettsäuren, aufwendig und teuer ist, ermöglicht das Protein-Screening den schnellen und preiswerten Nachweis neu exprimierter Proteine. Allerdings sind Protein-Nachweisverfahren in der Regel weniger sensitiv und zudem nur wenig informativ, da lediglich Merkmale, nicht aber einzelne *events* (siehe unten) unterschieden werden können. Daher kann zum Beispiel keine Aussage darüber gemacht werden, ob es sich bei einem Organismus um einen zugelassenen oder nicht zugelassenen GVO handelt. Der Nachweis von RNA ist ungeeignet für die GVO-Analytik, da die RNA aufgrund ihrer geringen Stabilität bei Lagerung oder Prozessierung des Untersuchungsmaterials abgebaut wird. Daher hat sich in Europa der Nachweis der Übergangssequenz zwischen Transgen und Wirtsgenom (*event*) mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) als Methode der Wahl für den qualitativen GVO-Nachweis durchgesetzt. Quantitative Analysen werden mittels *event*-spezifischer Real-Time PCR durchgeführt.

Bei beiden PCR-Varianten werden zwei kurze Oligonukleotid-Moleküle als Start-Moleküle (Primer) verwendet, um eine gesuchte DNA-Sequenz mithilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase spezifisch zu vervielfältigen. Die PCR zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus. In der Regel sind etwa 10 Zielmoleküle ausreichend für ein positives Signal in der PCR; und die Wahrscheinlichkeit dafür, dass eine spezifische Primer-Sequenz mit einer Länge von 20 Basenpaaren ein zweites Mal innerhalb eines Genoms mit einer Größe von etwa 10^9 Basenpaaren mit 100%iger Übereinstimmung auftritt, ist extrem gering.

Eine Beschränkung der Methode ergibt sich jedoch aus der Notwendigkeit, für jede Probe und jeden GVO-*event* eine separate, individuelle Reaktion durchzuführen. Bei hohem Probenaufkommen bedeutet dies einen großen Arbeits-, Zeit- und Kostenaufwand. Bei gleichzeitiger Anwendung mehrerer PCR-Systeme in einem Reaktionsansatz (*multiplex*-PCR) kann es wegen der Konkurrenz der verschiedenen PCR-Systeme um die Reaktionskomponenten zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Amplifikations-Effizienzen kommen. Daher ist auch der Einsatz der *multiplex*-PCR bestenfalls auf den Nachweis einiger weniger Zielsequenzen begrenzt. Auf der anderen Seite ist es bereits heute möglich, gleichzeitig bis zu mehrere tausend individuelle DNA-Sequenzen auf einem Mikro- oder Makrochip (Array-Technologie) zu identifizieren. Insofern stellt die separate individuelle Amplifikation in der PCR bei umfangreichen Untersuchungen den

„Flaschenhals“ in der Analytik dar. Allerdings ist auch mit Array-Technologien der direkte Nachweis von GVO ohne vorhergehende Amplifikation wegen der erheblichen Größe der pflanzlichen Genome derzeit noch nicht möglich.

In der Praxis wird eine Probe anfangs auf mehrere GVO-Screening-Elemente untersucht. Dies sind Promotor- oder Terminator-Sequenzen, die bei nahezu allen GVO für die Transformation verwendet werden und daher einen Rückschluss darauf zulassen, ob es sich bei einer Probe um einen GVO handelt oder nicht. Da diese Elemente ursprünglich aus natürlich vorkommenden Viren und Bakterien stammen, die häufig im Zusammenhang mit den zu untersuchenden Pflanzen oder in deren Umgebung auftreten, birgt dieses Vorgehen allerdings die Gefahr falsch positiver Ergebnisse. Fällt das Screening-Ergebnis positiv aus, werden anschließend *event*-spezifische PCRs für die infrage kommenden GVO durchgeführt.

In vielen Fällen stößt diese Strategie bereits heute an ihre Grenzen. Durch die Aufhebung des *de facto* Zulassungsmoratoriums der EU von 1998 ist die Anzahl von GVO auf dem Europäischen Markt sprunghaft gestiegen [6] und wird voraussichtlich in Zukunft in der EU und auf den globalen Märkten weiter zunehmen [7; 8]. Folglich wird der Bedarf an Deklarationskontrollen im Umfang steigen. Zusätzlich muss die Einfuhr von nicht in der EU zugelassenen GVO durch internationalen Handel überwacht werden. Für die Kennzeichnungskontrolle sind deshalb anpassungsfähige Standardmethoden erforderlich, die einen hohen Probendurchlauf ermöglichen.

Co-Extra

Im Jahr 2003 ist das vom 6. Forschungsrahmenprogramm der EU geförderte Forschungsprojekt Co-Extra (*GM and non-GM Supply Chains: Their Co-Existence and Traceability*) ins Leben gerufen worden. Ziel des Projekts ist es, angesichts der zu erwartenden massiven Zunahme von GVO auf dem EU-Markt die Koexistenz und Rückverfolgbarkeit von GVO entlang der Verarbeitungskette zu sichern.

Um dieser Herausforderung zu begegnen, besteht eine Aufgabenteilung in verschiedene Arbeitspakete („Workpackages“, WPs), dargestellt in Abbildung 1.

Das Co-Extra-Projekt wird durch das Konsortium-Management (WPO) unter der Leitung des *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA, Frankreich) koordiniert.

In WP1 werden Feldstudien durchgeführt, die die Eindämmung des Gen-Flusses in landwirtschaftlichen Systemen untersuchen. Dabei konzentrieren sich die Strategien zur Vermeidung einer Vermischung von gv- und konventionellen Kulturen auf biologische

Maßnahmen, um Überschneidungen mit dem EU-Forschungsprojekt SIGMEA zu vermeiden.

Eine zweite Arbeitsgruppe (WP2) beschäftigt sich mit der Beschreibung von Warenketten vom Saatgut bis zur Endproduktabgabe an den Verbraucher („vom Acker bis zum Teller“) und der Identifizierung kritischer Punkte, die ein besonderes Kontaminationsrisiko bergen. Entscheidungsgrundlagen (*decision tree*) für die Sicherung der Koexistenz sollen entwickelt werden. In WP3 werden die ökonomischen Kosten (und Nutzen) analysiert, die durch die Implementierung von Koexistenz und Rückverfolgbarkeit entstehen.

Ziel des vierten Arbeitspaketes (WP4) ist es, Kontrollpläne für den Einsatz ausgewählter GVO-Detektionsmethoden zu erarbeiten. Strategien für Probennahme und Testverfahren, die die gesamte Warenkette abdecken, sollen entwickelt und Validierungsmethoden verbessert werden.

In zwei Arbeitsgruppen wird an der Entwicklung von Methoden für die GVO-Detektion in Lebens- und Futtermitteln gearbeitet. Der Schwerpunkt in WP5 liegt auf der Verbesserung und Erweiterung bestehender Methoden, um kosteneffektive und zuverlässige Standardmethoden für die Quantifizierung von GVO zur Verfügung zu stellen. WP6 beschäftigt sich vor allem mit den technischen Herausforderungen der GVO-Detektion. Neue Methoden sollen entwickelt werden, um die Beschränkungen der herkömmlichen Nachweismethoden zu überwinden, beispielsweise bezogen auf Zeit- und Kostenfragen oder den Nachweis von unbekanntem GVO und *gene stacked events*.

Im Rahmen von WP7 werden Workpackage-übergreifend die Projektaktivitäten in rechtliche, soziale und ethische Zusammenhänge eingebettet. Unter anderem wird die weltweite Kompatibilität verschiedener Koexistenz- und Rückverfolgbarkeitssysteme untersucht. Die Arbeitsgruppe des WP8 steht im Dialog mit der Öffentlichkeit und verschiedenen Interessenvertretern, um einerseits Informationen und Entscheidungshilfen bereitzustellen und andererseits die bestehenden Erfordernisse und Erwartungen der Akteure einschätzen zu können. Informationen über Co-Extra werden unter anderem auf der projekteigenen Internetplattform zur Verfügung gestellt [9].

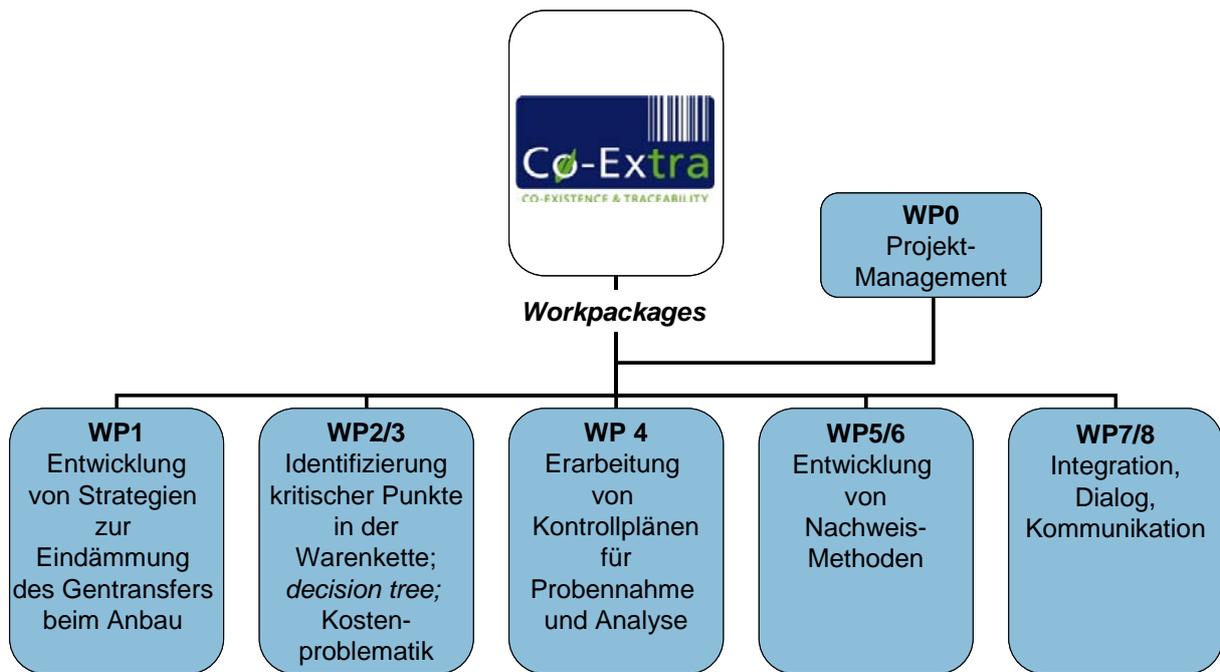


Abbildung 4 : Struktur des Co-Extra-Forschungsprojekts. Das Projekt ist in acht Arbeitspakete („Workpackages“) unterteilt und wird vom Projekt-Management (WP0) koordiniert.

Am Co-Extra-Projekt nehmen 56 Partner aus 16 Ländern teil. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) als Mit-Initiator ist am Projektmanagement (WP0) und im Bereich der Methodenentwicklung, „Technische Herausforderungen der GVO-Detektion“ (WP6), beteiligt. Im einem Aufgabenbereich des WP6, „Alternative Ansätze zur Zielsequenz- und Signal-Amplifikation“, sollen Alternativmethoden zur PCR mit den Schwerpunkten *multiplexing* und Array-Technologie entwickelt werden. Im Rahmen dieser Aufgabenstellung wird am BfR derzeit mit zwei Methoden gearbeitet, die im Folgenden vorgestellt werden.

Methodische Ansätze am BfR

Multiple Displacement Amplification (MDA)

Die MDA (dt. „Vielfache Verdrängungsamplifikation“) ist ein Verfahren der Gesamtgenomamplifikation. Die Methode wird am BfR für die Zielsequenz-Amplifikation eingesetzt.

Mithilfe des isothermen DNA-Polymerase des Bakteriophagen *phi29* kann die gesamte DNA einer Probe vervielfältigt werden. Das Funktionsprinzip ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt; Abbildung 3 zeigt die praktische Durchführung. Eine geringe Menge genomischer DNA (gDNA) wird zusammen mit kurzen Zufallsprimern (*random-Hexamere*) denaturiert. Nach Zugabe von Nukleotiden und der *phi29*-DNA-Polymerase

wird die gesamte Proben-DNA in einer isothermen Reaktion über Nacht amplifiziert. Wegen der Fähigkeit der *phi29*-DNA-Polymerase zur Strangverdrängung ist keine erneute Denaturierung der DNA notwendig, wie es beispielsweise bei den für die PCR (Polymerasekettenreaktion) verwendeten *Taq*-DNA-Polymerasen der Fall ist. Stößt das Enzym auf einen Doppelstrang, werden die Stränge durch die fortschreitende Polymerisation getrennt; an den entstandenen Einzelstrang können erneut Hexamer-Primer binden. Die DNA-Polymerase zeichnet sich außerdem durch eine hohe Prozessivität aus. Abhängig vom Reaktionsvolumen und unabhängig von der Menge an eingesetzter gDNA wird eine Menge von mindestens 5 µg hochmolekularer DNA mit Fragmentlängen bis zu 70 kb generiert [10]. Die 3'→5' Exonuklease-Aktivität der *phi29*-DNA-Polymerase resultiert in geringen Fehlerraten zwischen 10^{-5} und 10^{-6} [11; 12] im Vergleich zur Fehlerrate der *Taq*-DNA-Polymerase von etwa 10^{-3} [13; 14]. Die Amplifikation erfolgt gleichmäßig über das gesamte Genom, mit einer höchstens etwa 3-fachen Über- oder Unterrepräsentation bestimmter Genabschnitte [15; 16; 17].

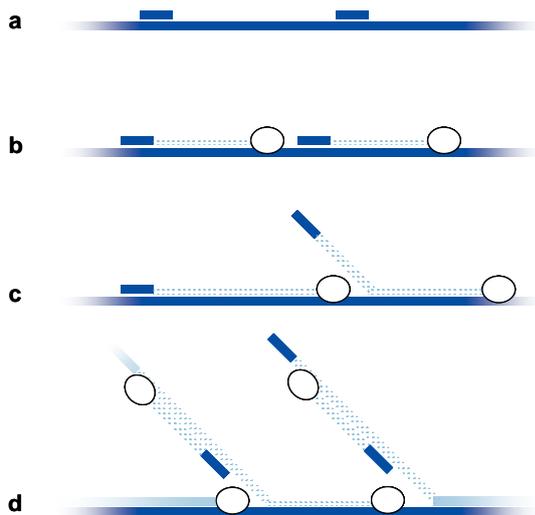


Abbildung 4: Prinzip der MDA. *Random*-Hexamere binden an denaturierte DNA (a) und werden durch die *phi29*-DNA-Polymerase polymerisiert (b). Durch die Strangverdrängungsaktivität des Enzyms werden Einzelstränge generiert (c), an die weitere Primer binden und erneut polymerisiert werden (d).

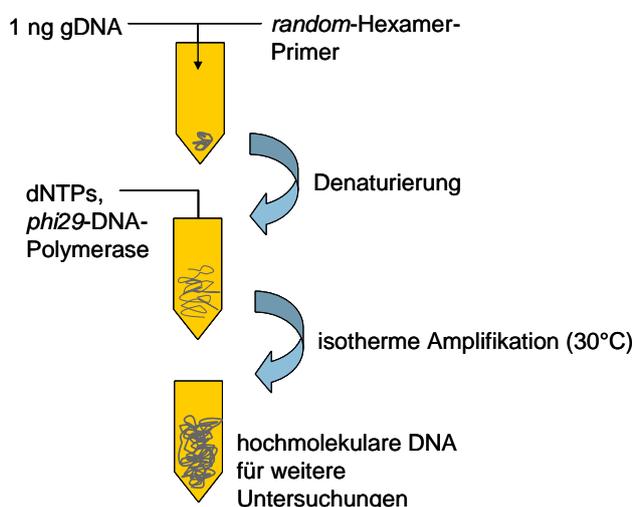


Abbildung 5: Praktische Durchführung der MDA. Eine kleine Menge genomischer DNA (gDNA) wird unter Zugabe von *random*-Primern denaturiert. Nach Hinzufügen von *phi29*-DNA-Polymerase und Nucleotiden wird über Nacht bei 30°C hochmolekulare DNA generiert

Untersuchungen des BfR zur Eignung von mittels MDA vervielfältigter gv-Mais-DNA für die GVO-Analyse haben gezeigt, dass die amplifizierte DNA eine hohe Qualität aufweist und ohne zusätzliche Behandlung direkt für weitere Untersuchungen eingesetzt werden kann [21]. Die Abbildung 4 zeigt vergleichend Real-Time PCR Amplifikationskurven und Standardkurven von genomischer und mit MDA vervielfältigter DNA. Die amplifizierte DNA verhält sich bezüglich Effizienz und Linearität vergleichbar zur Ausgangs-DNA. Einerseits kann durch die Vervielfältigung der Proben-DNA mittels MDA Referenzmaterial für die GVO-Analyse hergestellt werden. Dies ist besonders dann hilfreich, wenn nur begrenzte Mengen an Referenz-DNA zur Verfügung stehen. Beispielsweise kann bei dem Auftreten nicht zugelassener GVO auf dem europäischen Markt, wie dem LL601-Reis im Jahr 2006 [18], ein plötzlicher Bedarf an Referenzmaterial entstehen, der nicht rechtzeitig durch eine kommerzielle, herkömmliche Produktion gedeckt werden kann. Andererseits können mithilfe der MDA große Mengen DNA zur Verfügung gestellt werden, um eine anschließende Detektion GVO-spezifischer Sequenzen durch Hybridisierung an immobilisierte Fangsonden zu ermöglichen.

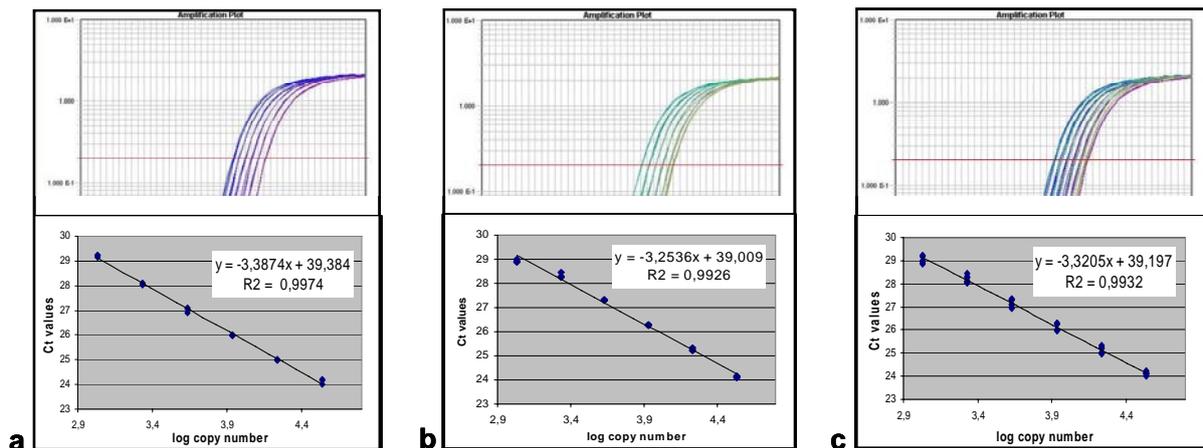


Abbildung 6: Real-Time PCR Amplifikationskurven und Standardkurven für Verdünnungsreihen aus genomischer Mais-DNA (a) und daraus mittels MDA vervielfältigter DNA (b). Bei Darstellung der Daten aus (a) und (b) in einer gemeinsamen Graphik wird das identische Verhalten beider DNA-Arten in der Real-Time PCR sichtbar (c).

Modifizierte Real-Time Immuno-PCR für die DNA-Detektion (DNA-RT-iPCR)

In Ergänzung zur Zielsequenz-Amplifikation durch die MDA wird am BfR ein methodischer Ansatz der Signal-Amplifikation getestet. Durch eine Kombination von komplementärer Sondenhybridisierung, immunologischer Detektion und einer uniformen PCR wird eine Signalverstärkung erreicht, die den parallelen Nachweis verschiedener spezifischer Sequenzen in genomischer DNA beziehungsweise in mittels MDA vervielfältigter

DNA ermöglichen soll. Alle Reaktionsschritte werden in demselben Reaktionsgefäß durchgeführt. Das Prinzip basiert auf der Real-Time Immuno-PCR (RT-iPCR), einer Methode aus dem Gebiet der Proteinanalytik, die erfolgreich für die ultra-sensitiven Detektion von Proteinen eingesetzt wird [19].

Am BfR ist die RT-iPCR für die Detektion von DNA modifiziert worden (DNA-RT-iPCR). Das Funktionsprinzip ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Sequenz-spezifische PNA-Fangsonden werden in Real-Time PCR-kompatiblen Mikrotiterkavitäten immobilisiert. Bei PNAs (Peptidnukleinsäuren) handelt es sich um synthetische DNA-Analoga, die ein Polypeptid-Gerüst anstatt eines Zucker-Phosphat-Gerüsts aufweisen. Die komplementäre Bindung von DNA-Molekülen erfolgt nach den bekannten Basenpaarungsregeln der DNA-DNA-Bindung. Die Strukturmodifikation der PNAs führt jedoch zu veränderten chemischen Eigenschaften, die eine höhere Bindungsstärke der PNA-DNA-Bindung bei gleichzeitig höherer Selektivität bewirken [20]. Die extrem starke Bindung der PNA-Fangsonden an ihre Zielmoleküle ermöglicht es, durch intensive Waschstschritte zwischen den einzelnen Reaktionsschritten die Hintergrundsignale der DNA-RT-iPCR-Methode gering zu halten. Die immobilisierten PNA-Fangsonden werden in einem Hybridisierungsschritt mit Biotin-markierter Proben-DNA inkubiert. Komplementäre Ziel-DNA bindet an die Sonden, während ungebundene DNA durch anschließendes Waschen entfernt wird. Danach wird zur Reaktion ein präformiertes Detektions-Konjugat gegeben, das aus Streptavidin und kurzen, doppelsträngigen DNA-Molekülen mit einer einheitlichen Sequenz, der *reporter*-DNA, besteht. Das Konjugat bindet immunologisch über Biotin-Streptavidin-Interaktion an die hybridisierte Ziel-DNA. Durch erneutes Waschen wird ungebundenes Konjugat entfernt. Anschließend kann das gebundene Konjugat mittels eines für die *reporter*-DNA spezifischen Real-Time PCR-Systems quantifiziert werden. Durch den Einsatz einer einheitlichen Real-Time PCR wird die Durchführung individueller PCRs vermieden. Für alle Kavitäten einer Mikrotiterplatte, die verschiedene Fangsonden für den parallelen Nachweis unterschiedlicher GVO enthalten können, kann der gleiche Real-Time PCR-Mix verwendet werden. Eine Erweiterung des Systems durch Hinzufügen neuer PNA-Sonden ist jederzeit möglich.

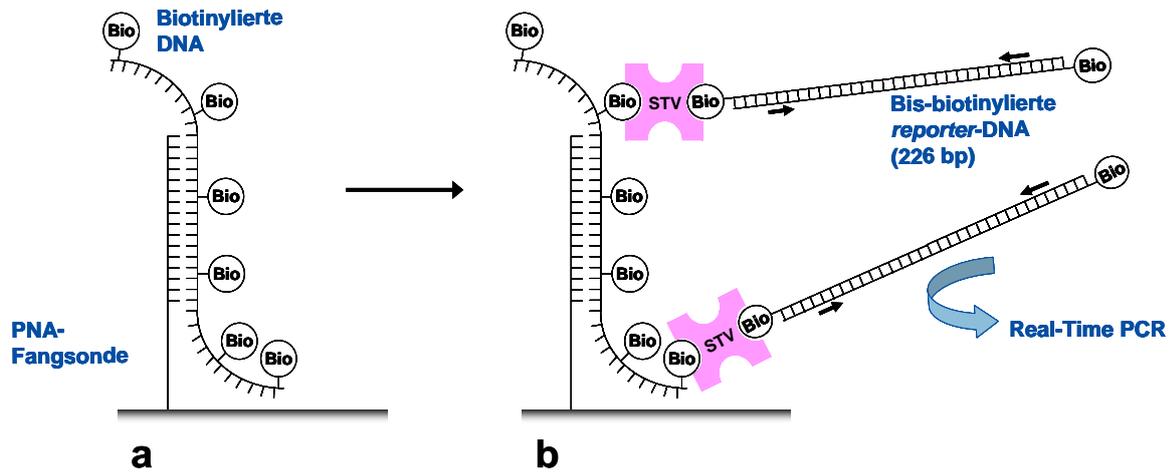


Abbildung 7: Biotinylierte Ziel-DNA bindet komplementär an immobilisierte PNA-Fangsonden (a). Zu der hybridisierten Ziel-DNA wird das präformierte Detektions-Konjugat, bestehend aus Streptavidin und einer uniformen *reporter*-DNA, gegeben. Anschließend wird das gebundene Konjugat mittels eines für die *reporter*-DNA spezifischen Real-Time PCR-Systems quantifiziert (b).

Trotz intensiven Waschens und Blockens zwischen den einzelnen Reaktionsschritten sind Hintergrundsignale nicht völlig zu vermeiden. Daher muss durch den Einsatz von Negativ-Kontrollen ein *Cut-off* definiert werden, um zwischen positiven und negativen Signalen zu unterscheiden.

Am BfR wurde bisher ein Modell der DNA-RT-iPCR etabliert, mit dem kurze Ziel-DNA-Moleküle mit einer Länge von 30 bis 70 bp detektiert werden können. Abbildung 6 zeigt beispielhaft die Amplifikationskurven für zwei verschiedene PNA-Sonden, die mit dem gleichen 30mer-Oligonukleotid hybridisiert wurden. Der Ct-Wert-Unterschied zwischen der zur Ziel-DNA komplementären PNA-Sonde und der negativ-Kontrolle beträgt 13,6 für die gegebene Konzentration von 6 fmol des Zielmoleküls pro Hybridisierungsreaktion.

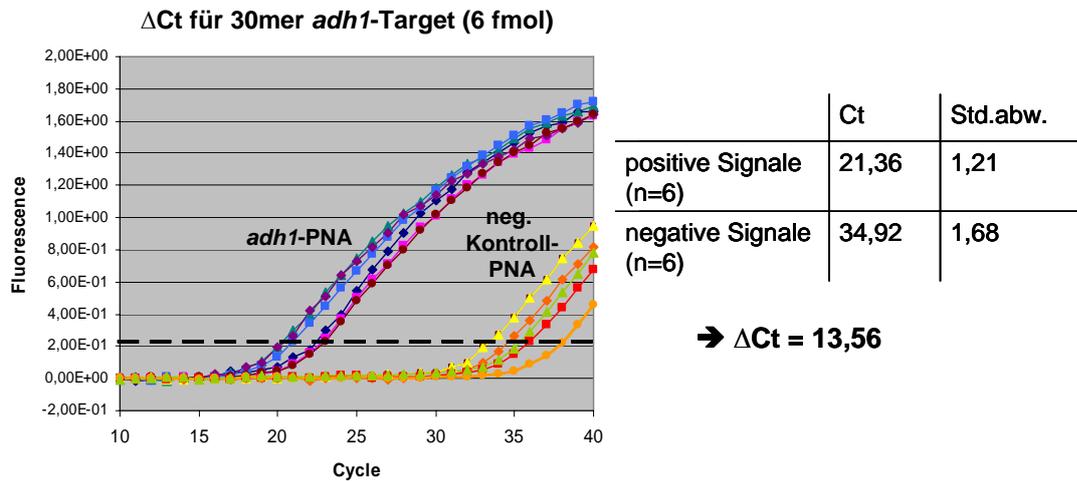


Abbildung 8: Amplifikationskurven der DNA-RT-iPCR für zwei verschiedene PNA-Sonden, die mit dem gleichen 30mer-Oligonukleotid (*adh1*-Target, 6 fmol pro Hybridisierungsreaktion) hybridisiert wurden. Der Ct-Wert-Unterschied zwischen der zur Ziel-DNA komplementären PNA-Sonde (*adh1*-PNA) und der Negativkontrolle beträgt 13,6.

Momentan wird am BfR an einer Verbesserung der Sensitivität und weiteren Reduktion des Hintergrundes gearbeitet.

Geplant ist die Kombination von MDA und DNA-RT-iPCR für den parallelen, qualitativen Nachweis verschiedener GVO in einem Reaktionsansatz. In einem ersten Schritt soll extrahierte genomische DNA mittels MDA angereichert und gleichzeitig biotinyliert werden, um genügend Ausgangsmaterial zur Verfügung zu stellen (Zielsequenz-Amplifikation). Anschließend soll mittels DNA-RT-iPCR eine direkte Hybridisierung an event-spezifische Fangsonden in Kombination mit immunologischer Detektion und uniformer Real-Time PCR erfolgen (Signal-Amplifikation).

Danksagung

Dieses Projekt wird finanziell gefördert durch die Europäische Kommission im Rahmen des integrierten Projekts "Co-Extra", Vertrag Nr. 7158 (2003), des 6. Forschungsrahmenprogramms, Priorität 5, Lebensmittelqualität und -sicherheit.

Literatur

1. Eurobarometer. http://ec.europa.eu/public_opinion/index_en.htm
2. Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. März 2001 über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG

3. Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit
4. Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel
5. Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über die Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung von genetisch veränderten Organismen und über die Rückverfolgbarkeit von aus genetisch veränderten Organismen hergestellten Lebensmitteln und Futtermitteln sowie zur Änderung der Richtlinie 2001/18/EG HTML PDF
6. EC 2007: http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm
7. Clive, James (2006). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. ISAAA, International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. Brief No. 35 – www.isaaa.org
8. OECD 2007: <http://www2.oecd.org/biotech>
9. Internet-Homepage Co-Extra: <http://www.coextra.eu/>
10. Blanco, L., Bernad, A., Lazaro, J. M., Martin, G., Garmendia, C., & Salas, M. (1989). Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J.Biol.Chem.*, 264(15), 8935-8940
11. Esteban, J. A., Salas, M., Blanco, L. (1993). Fidelity of phi 29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization. *J.Biol.Chem.* 268(4), 2719-2726
12. Nelson, J.R., Cai, Y.C., Giesler, T.L., Farchaus, J.W., Sundaram, S.T., Ortiz-Rivera, M., Hosta, L.P., Hewitt, P.L., Mamone, J.A., Palaniappan, C., Fuller, C.W. (2002). TempliPhi, phi29 DNA polymerase based rolling circle amplification of templates for DNA sequencing. *Biotechniques*, 32(6), Supplements, 44-47
13. Dunning, A.M., Talmud, P., Humphries, S.E. (1988). Errors in the polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Research* 16(21), 10393
14. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-91
15. Dean, F.B., Hosono, S., Fang, L., Wu, X., Faruqi, A.F., Bray-Ward, P., Sun, Z., Zong, Q., Du, Y., Du, J., Driscoll, M., Song, W., Kingsmore, S.F., Egholm, M. & Lasken, R.S. (2002): Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (8): 5261-5266.
16. Hosono, S., Faruqi, A.F., Dean, F.B., Du, Y., Sun, Z., Wu, X., Du, J., Kingsmore, S.F., Egholm, M. & Lasken, R.S. (2003): Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples. *Genome Research* 13 (5): 954-964.
17. Pinard, R., de Winter, A., Sarkis, G., Gerstein, M., Tartaro, K., Plant, R., Egholm, M, Rothberg, J. & Leamon, J. (2006): Assessment of whole genome amplification-induced bias through high-throughput, massively parallel whole genome sequencing. *BMC Genomics* 7 (1): 216.
18. RASFF 2006. Rapid Alert System for Food and Feed, Annual Report 2006; http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2006_en.pdf
19. Niemeyer, C.M., Adler, M., Wacker, R. (2005): Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification; Review; *Trends in Biotechnology* 23 (4)
20. Brandt, O., Hoheisel, J.D. (2004): Peptide nucleic acids on microarrays and other biosensors. *Trends in Biotechnology* 22 (12)
21. Roth, L., Zagon, J., Laube, I., Holst-Jensen, A., Broll, H. (2008): Generation of Reference Material by the Use of Multiple Displacement Amplification (MDA) for the Detection of Genetically Modified Organisms (GMOs). *Food Analytical Methods* (im Druck) DOI: 10.1007/s12161-008-9024-5

Bisher sind in dieser Schriftenreihe folgende Bände erschienen:

Band 1 Fachtagung „Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz“
in Oberschleißheim am 13. Oktober 2005

sowie der vorliegende

Band 2 Gentechnik in Oberschleißheim am 25. Oktober 2007



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

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

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

Internet: www.lgl.bayern.de
E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de

Gestaltung & Druck: Kaiser Medien GmbH

ISSN 1866-7767 Print Version
ISBN 978-3-939652-61-8 Print Version

Bisher sind in dieser Schriftenreihe folgende Bände erschienen:

Band 1 Fachtagung „Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz“
in Oberschleißheim am 13. Oktober 2005

sowie der vorliegende

Band 2 Gentechnik in Oberschleißheim am 25. Oktober 2007

Herausgeber: Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen
Telefon: 09131 764-0
Telefax: 09131 764-102

Internet: www.lgl.bayern.de
E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de
Fotos: Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

Komplettherstellung: Kaiser Medien GmbH, Nürnberg
Stand: Juli 2008

© Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, alle Rechte vorbehalten
Gedruckt auf Papier aus 100 % Altpapier

Bei fachlichen Fragen wenden Sie sich bitte an:

Dr. Ulrich Busch
Telefon: 089 31560-234
E-Mail: ulrich.busch@lgl.bayern.de

ISSN 1866-7767 Print Version
ISBN 978-3-939652-61-8 Print Version

Diese Druckschrift wird kostenlos im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit der Bayerischen Staatsregierung herausgegeben. Sie darf weder von den Parteien noch von Wahlwerbern oder Wahlhelfern im Zeitraum von fünf Monaten vor einer Wahl zum Zweck der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für Landtags-, Bundestags-, Kommunal- und Europawahlen. Missbräuchlich ist während dieser Zeit insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Informationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken und Aufkleben parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist gleichfalls die Weitergabe an Dritte zum Zweck der Wahlwerbung. Auch ohne zeitlichen Bezug zu einer bevorstehenden Wahl darf die Druckschrift nicht in einer Weise verwendet werden, die als Parteinahme der Staatsregierung zugunsten einzelner politischer Gruppen verstanden werden könnte. Den Parteien ist es gestattet, die Druckschrift zur Unterrichtung ihrer eigenen Mitglieder zu verwenden. Bei publizistischer Verwertung - auch von Teilen - wird um Angabe der Quelle und Übersendung eines Belegexemplars erbeten. Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte sind vorbehalten. Die Broschüre wird kostenlos abgegeben, jede entgeltliche Weitergabe ist untersagt. Diese Broschüre wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Für die Inhalte fremder Internetangebote sind wir nicht verantwortlich.



BAYERN | DIREKT ist Ihr direkter Draht zur Bayerischen Staatsregierung.
Unter Tel. 0180 1 201010 (3,9 Cent pro Minute aus dem deutschen Festnetz; abweichende Preise aus Mobilfunknetzen) oder per E-Mail unter direkt@bayern.de erhalten Sie Informationsmaterial und Broschüren, Auskunft zu aktuellen Themen und Internetquellen sowie Hinweise zu Behörden, zuständigen Stellen und Ansprechpartnern bei der Bayerischen Staatsregierung.

BAYERN I DIREKT Tel.: 0180 1 201010
3,9 ct/min aus dem deutschen Festnetz;
max. 42 ct/min aus den Mobilfunknetzen.