

Etablierung einer PCR–Routineanalytik für das Monitoring transgener Rapspflanzen

Dr. Reinhard Zeitler, LfU

Monitoringkonzepte für transgene (gentechnisch veränderte) Rapspflanzen gehen davon aus, dass eine potenzielle Verwilderung oder Auskreuzung der entsprechenden gentechnischen Veränderung beobachtet werden muss. Für die Realisierung dieser Konzepte sind labortechnische Voraussetzung erforderlich, die den Nachweis gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP) in der Umwelt ermöglichen. Die Identität einer gentechnischen Veränderung ist durch ihre DNA–Sequenz gegeben. Diese kann durch die sogenannte Polymerase–Kettenreaktion (PCR–Reaktion) mit hoher Spezifität und Empfindlichkeit nachgewiesen werden[1]. Der PCR–Nachweis ist daher ausgezeichnet für die Routineanalytik geeignet.

Für die Etablierung einer PCR–Routineanalytik müssen validierte PCR–Methoden entwickelt werden. Dies setzt die Kenntnis relevanter DNA–Sequenzen voraus, die größtenteils in öffentlichen und nicht–öffentlichen Datenbanken zur Verfügung stehen. Eine spezielle PCR–Entwicklungs–Software ermöglicht die Optimierung geeigneter PCR–Nachweisreaktionen. Anschließend werden in Validierungsmessungen Verfahrenskenndaten wie Spezifität, Präzision, Nachweisgrenze und Robustheit der Methode erfasst. Am gentechnischen Überwachungslabor des LfU wurden so Nachweisreaktionen für drei Herbizidtoleranz–vermittelnde Gene (eps, pat und bar) etabliert. Sie ermöglichen den Nachweis nahezu aller transgener Rapsorten, die für ein Langzeitmonitoring in Frage kommen.

Für die PCR–Analytik können verschiedene Pflanzenmaterialien verwendet werden. Am besten geeignet sind Blätter und Samen. Da der Nachweis transgener DNA in einer Blattprobe die Existenz einer etablierten transgenen Pflanze dokumentiert, werden im Modellprojekt des LfU „Langzeitmonitoring möglicher Auswirkungen des landwirtschaftlichen Anbaus gentechnisch veränderter Pflanzen auf die einheimische Flora“ seit Mai 2000 Blattmischproben aus der Umwelt entnommen und untersucht [2] (siehe Beitrag von Frau Dr. A. Theenhaus). Der Nachweis erfolgt mit der sondengestützten TaqMan–PCR. Diese Methode ermöglicht darüber hinaus eine Quantifizierung transgener DNA–Anteile [3].

Transgene Raps–DNA kann auch in Rapspollen nachgewiesen werden. Bei diesem Konzept können mit geeigneten technischen Hilfsmitteln mehrere 1.000 Pollen in nur einer Probe gesammelt werden. Die Realisierbarkeit dieses Konzeptes wird derzeit im Rahmen des Projekts „Prüfung der Raumrepräsentativität von Pollensammlern für ein Langzeitmonitoring von GVP“ (siehe Beitrag von Frau Dr. H. Beismann) geprüft.

Schon jetzt ist absehbar, dass eine PCR–Routineanalytik für das Monitoring transgener Rapspflanzen sowohl erforderlich als auch realisierbar ist. Eine PCR–Routineanalytik würde nach ihrer Etablierung im Rahmen eines langfristig angelegten GVP–Monitorings die Erhebung von zuverlässigen Daten über die Verbreitung gentechnisch veränderter Pflanzen in der Umwelt ermöglichen. Es bleibt jedoch zu klären, welches Probenmaterial zu den aussagekräftigsten Daten führt und in welchem Umfang Proben für ein Monitoring erhoben werden müssen, damit langfristige Interpretationen über mögliche Auswirkungen des landwirtschaftlichen Anbaus gentechnisch veränderter Rapspflanzen auf die Flora möglich sind.

Literatur


- [1] Zeitler, R. u. Baumeister, W.: Nachweis gentechnischer Veränderungen in Pflanzen und ihre Identifizierungsmöglichkeiten. Schriftenreihe des LfU, Heft 158, S.22 – 24 . Artikel im Internet, Augsburg (2000).
- [2] Theenhaus, A., Zeitler, R., von Brackel, W., Botsch, H.–J., Baumeister, W. und Peichl, L.: Langzeitmonitoring möglicher Auswirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen auf Pflanzengesellschaften. Konzeptentwicklung am Beispiel von Raps (Brassica napus). Zeitschrift für Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung, 14 (4), S. 229 – 236, (2002).
- [3] Zeitler, R., Pietsch, K. und Waiblinger, HU.: Validation of Real-time PCR methods for the Quantification of transgenic contaminations in rape seed. Eur Food Res Technol 214: 346 – 351, (2002)

Umweltschutzrelevante Fragestellungen

1. Wie kann ein **bayernweiter Überblick über die Verbreitung transgener Rapspflanzen** in der Natur erreicht werden?
2. **Verwilderung:**
Kann sich transgener Raps in der freien Natur etablieren?
3. **Auskreuzung:**
Können sich **Hybride aus transgenem Raps mit wildverwandten Kreuzungspartnern** in der Natur etablieren?
4. Kommt es durch den landwirtschaftlichen Anbau von GVPs zu **Populationsverschiebungen**

© LfU/Referat24/ Dr. Reinhard Zedler/2003

Einführung


Bayerisches Landesamt für Umweltschutz 

Beitrag der GVP-Analytik

1. Nachweis transgener DNA
2. Charakterisierung gentechnischer Veränderungen
3. Identifizierung von GVP
4. Quantifizierung von GVP-Anteilen

© LfU/Referat24/ Dr. Reinhard Zedler/2003

Einführung

Bayerisches Landesamt für Umweltschutz 

Zielsetzungen

1. Etablierung von geeigneten PCR-Nachweisreaktionen für transgene Raps-DNA
2. Handhabung verschiedener Probematerialien (Blätter, Samen, Pollen, Honig u.a.)
3. Etablierung von QM-Maßnahmen für die Routineanalytik
4. Etablierung einer PCR-Analytik für transgene Pollen

Stand der Genehmigungen für das Inverkehrbringen von transgenem Raps in der EU

Antragsteller AZ EU AZ RKI	Eingereicht Mitgliedsland Jahr	Produkt	Gentechnische Veränderung	Bemerkungen	Datum der Bescheide der nationalen Behörde
Fa. Plant Genetic Systems C/UK/94MU/1 6788-02-5	Großbritannien 1994	MS1; RF1	Männliche Sterilität (System zur Erzeugung von Hybridsaatgut) und Toleranz gegen Herbizide mit dem Wirkstoff Phosphinotrichin	Verfahren in der EU abgeschlossen. Positive Entscheidung durch die EU (1995) Eingeschränkter Zweck, (noch) nicht für Lebensmittel- oder Futtermittelzwecke	28.02.96
Fa. Plant Genetic Systems C/F/9505-21/A 6788-02-9 C/F/9505-31/B 6788-02-10	Frankreich 1995	MS1; RF1; RF2 (2 Anträge, da 2 Linien)	Männliche Sterilität (System zur Erzeugung von Hybridsaatgut) und Toleranz gegen Herbizide mit dem Wirkstoff Phosphinotrichin	Verfahren in der EU abgeschlossen. Positive Entscheidung durch die EU (1997)	-
Fa. AgrEvo C/DE/96/6 6788-01-5	Deutschland 1996	Falcon GS40/90 pHoe6/Ac	Toleranz gegen Herbizide mit dem Wirkstoff Phosphinotrichin	Verfahren in der EU noch nicht abgeschlossen.	
Fa. AgrEvo C/UK/96M15/1 6788-02-11	Großbritannien 1996	Topas 19/2, HCN92	Toleranz gegen Herbizide mit dem Wirkstoff Phosphinotrichin	Verfahren in der EU abgeschlossen. Positive Entscheidung durch die EU (1998) Eingeschränkter Zweck (Import, Lagerung, Verarbeitung), kein Anbau in der EU	09.06.98
Fa. Plant Genetic Systems C/B/95/01 6788-02-13	Belgien 1996	MS8; RF3	Männliche Sterilität (System zur Erzeugung von Hybridsaatgut) und Toleranz gegen Herbizide mit dem Wirkstoff Phosphinotrichin	Verfahren in der EU noch nicht abgeschlossen.	
Fa. AgrEvo C/DE/96/6 6788-01-06	Deutschland 1996	Liberator pHoe6/Ac	Toleranz gegen Herbizide mit dem Wirkstoff Phosphinotrichin	Verfahren in der EU noch nicht abgeschlossen.	

Quelle: www.rki.de (Stand 2003)

Nachweismöglichkeiten für verschiedene transgene Rapslinien

Status	RKI-AZ	Trans-formatiostyp	Neomycin-Resistenz	35S-Promotor	Basta-Resistenz (pat-Gen)	Basta-Resistenz (bar-Gen)	Roundup-Ready-Resistenz (gox-Gen)	Roundup-Ready-Resistenz (epspse-Gen)
b.ae	8, 18, 43, 52, 53, 101	Falcon GS40/98 pHoe6/Ac	-	+	+	-	-	-
b.ae	52, 53, 101	Liberator pHoe6/Ac	-	+	+	-	-	-
b	61	23-198	+	+	-	-	-	-
		GT200	-	-	-	-	+	+
b	70	GT73	-	-	-	-	goxv247	+
b.ae	90	MS8	-	-	-	+	-	-
b.ae	90	RF3	-	-	-	+	-	-
(ze)		Topas19-2	+	+	+	-	-	-
(ze)		HD C92						
(ze)		MS1	+	-	-	+	-	-
(ze)		RF1	+	-	-	+	-	-
ze		RF2	+	-	-	+	-	-

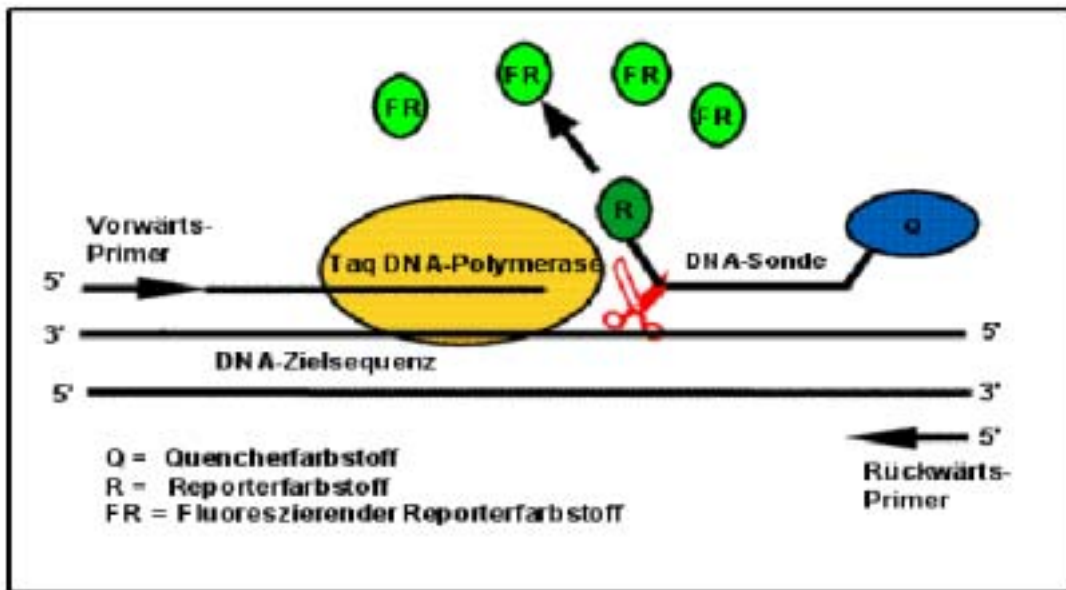
Strategie der Analytik von transgenem Raps

- Nachweis des eps-Gens, das eine Toleranz gegenüber dem Herbizid Roundup-Ready vermittelt.
- Nachweis des synthetischen pat-Gens, das eine Toleranz gegenüber dem Herbizid BASTA vermittelt.
- Nachweis des bar-Gens aus Streptomyces hygroscopicus, das eine Toleranz gegenüber dem Herbizid BASTA vermittelt.



Mit den Nachweisreaktionen für **eps, pat und bar** werden die wichtigsten transgenen Rapslinien erfasst, die weltweit angebaut werden bzw. zum Anbau kommen sollen.

Prinzip der Taq-Man-PCR



© LMU/Melera/Zil/Dr. Reinhard/Zitler/2003

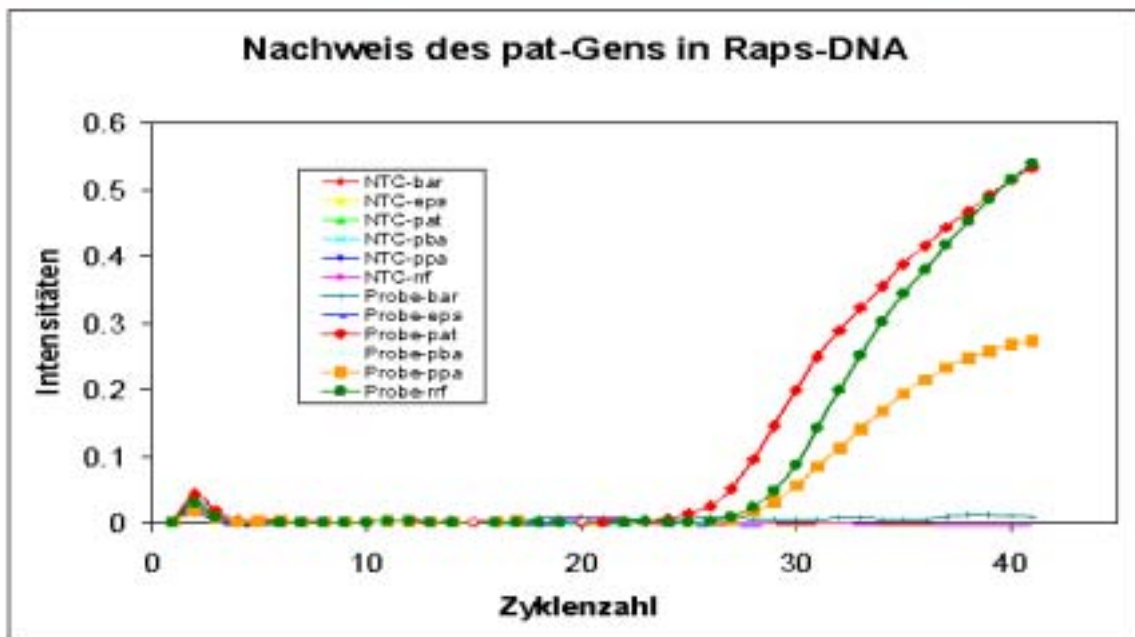
PCR-Analytik

Bayerisches Landesamt
für Umweltschutz



Spezifität des pat-Gen-Nachweises

Nachweis des pat-Gens in Raps-DNA



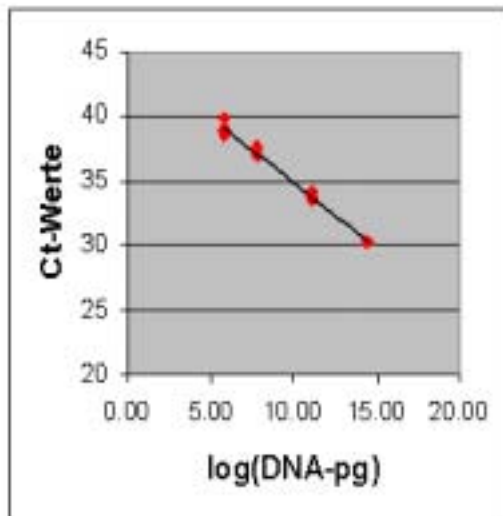
© LMU/Melera/Zil/Dr. Reinhard/Zitler/2003

PCR-Analytik

Bayerisches Landesamt
für Umweltschutz

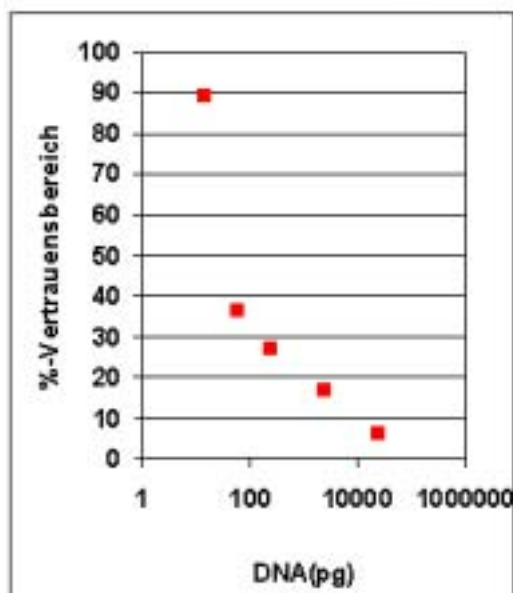


Nachweis des pat-Gens durch TaqMan-PCR



- Das pat-Gen vermittelt in transgenem Raps eine Resistenz gegen das Herbizid BASTA
- Es wurde hier in einer DNA-Präparation aus transgenem Winterraps der Sorte Avalon vom Freisetzungsort der BBA nachgewiesen
- Der Ct-Wert entspricht der Anzahl der PCR-Zyklen, die notwendig waren um einen vorgegebenen Schwellenwert der Fluoreszenzmessung zu überschreiten
- Die Lineare Abhängigkeit des Ct-Wertes vom Logarithmus der eingesetzten DNA-Menge kennzeichnet optimale Bedingung bei der Durchführung der TaqMan-PCR

Ermittlung der Bestimmungsgrenze des pat-Gen Nachweises



- Für jede DNA-Konzentration wurden 5-Fachmessungen durchgeführt.
- Anhand der Kalibrierkurve werden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.
- Durch Anwendung der t-Verteilung können Vertrauensbereich für die vorgenommene Messung angegeben werden.
- Der Vertrauensbereich wird mit 95% Sicherheit angegeben.



Ergebnisse Freisetzung Kühbach

Spezifität des Nachweises (Bezeichnung der transgenen Rapssorte)	Ergebnis
Rapsspezifisches Gen	positiv
Falcon 6/Ac	negativ
GT73	negativ
MS1-RF1 bzw. MS1-RF2 und MS8-RF3	positiv
MS1-RF1 bzw. MS1-RF2, nicht MS8-RF3	positiv

Konzept

- Routinemäßige Probenahme von Blattmischproben
- Routinemäßige Analyse nach Prüfplan

↓

**Nachweis von GVP
In der Umwelt möglich**

© LFU/ReferatZSL/Dr. ReinhardZitler©2003 Blattmischproben Bayerisches Landesamt für Umweltschutz

Anwendung der PCR-Analytik für wildverwandte Brassicaceen-Arten

Problem:

Für den Nachweis transgener DNA in wildverwandten Brassicaceen-Arten kann ein falsch negatives Ergebniss durch Inhibitoren in der PCR-Reaktion nicht a priori ausgeschlossen werden.

Lösung:

1. Isolierung der DNA aus wildverwandten Brassicaceen-Arten
2. Herstellung einer DNA-Mischung mit transgener Raps-DNA
3. Nachweis der transgenen DNA in der DNA-Mischung



Ergebnis:

Es gibt bisher keinen Hinweis dafür, dass transgene DNA-Sequenzen in den 47 bisher untersuchten Brassicaceen-Arten durch PCR-Analytik nicht nachgewiesen werden könnte.

Liste der PCR-fähigen Kreuzblütlerarten

<i>Alharia petiolata</i>	<i>Cardamine impatiens</i>	<i>Rorippa amphibia</i>
<i>Alyssum alyssoides</i>	<i>Cardamine pratensis</i>	<i>Rorippa anceps</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Cardaminopsis arenosa ssp. borbaasi</i>	<i>Rorippa palustris</i>
<i>Arabis hirsuta</i>	<i>Descurainia sophia</i>	<i>Rorippa sylvestris</i>
<i>Armoracia rusticana</i>	<i>Diplotaxis muralis</i>	<i>Sinapis alba</i>
<i>Barbarea stricta</i>	<i>Erophila verna</i>	<i>Sinapis arvensis</i>
<i>Barbarea vulgaris</i>	<i>Erucastrum gallicum</i>	<i>Sisymbrium austriacum</i>
<i>Brassica napus</i>	<i>Erysimum cheirantoides</i>	<i>Sisymbrium officinale</i>
<i>Brassica rapa</i>	<i>Isatis tinctoria</i>	<i>Thlaspi arvense</i>
<i>Bunias orientalis</i>	<i>Lepidium campestre</i>	<i>Thlaspi montanum</i>
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	<i>Nasturtium officinale</i>	<i>Thlaspi perfoliatum</i>
<i>Cardamine amara</i>	<i>Neslia paniculata</i>	<i>Turritis glabra (syn. Arabis glabra)</i>
<i>Cardamine flexuosa</i>	<i>Raphanus raphanistrum</i>	
<i>Cardamine hirsuta</i>	<i>Raphanus sativus</i>	Gesamtzahl: 40

Fettgedruckt sind die mit Raps kreuzungsfähigen Arten gekennzeichnet.

(Stand: 13.02.2003)

Überblick über verschiedene Probenmaterialien



Kenndaten für verschiedene Probenarten

Probenart	Probenmenge	Analysenmenge	Anzahl GVPs	Vegetationsstatus	Einzugsgebiet
Blattmischproben	100 Blätter von 100 Pflanzen	100 Blätter von 100 Pflanzen	100	etablierte Pflanze	Population am Ort
Pollen aus Honig	250 g	10 g	1000	Pollen	Lebensraum der Biene
Pollen von Pollensammlern	10 000 Pollen	10 000 Pollen	10 000	Pollen	regionaler Pollenflug
Samenmischprobe	1000 Samen von 100 Pflanzen	1000 Samen von 100 Pflanzen	1000	Same	Population am Ort

Bewertung der verschiedenen Probenarten

Probenart	Vorteile		Nachteile	
Blattnischproben	etablierte Pflanze	-	< 100 GVPs	geringe Flächenabdeckung
Pollen aus Honig	>1000 GVPs	sehr große Flächenabdeckung	GVP vor Befruchtung	-
Pollen von Pollensammlern	>10000 GVPs	große Flächenabdeckung	GVP vor Befruchtung	-
Samenmischprobe	>1000 GVPs	-	GVP vor Etablierung	geringe Flächenabdeckung

© LfU/ReferatZ&V/Dr. BeinhartZ/0103

Probenahme

Bayerisches Landesamt für Umweltschutz



Prüfplan für Honig



© LfU/ReferatZ&V/Dr. BeinhartZ/0103

Honigproben

Bayerisches Landesamt für Umweltschutz



Ergebnisse für Honig in 2001

Proben-Nr.	Probenmenge	Analysenmenge	Rapsspez. DNA	eps	pat	bar
1005901	250 g	10 g	positiv	negativ	negativ	negativ
1005902	250 g	10 g	positiv	negativ	negativ	negativ
1005903	250 g	10 g	positiv	negativ	negativ	negativ
1005904	250 g	10 g	positiv	negativ	negativ	negativ
1005906	250 g	10 g	positiv	negativ	negativ	negativ
1005907	250 g	10 g	positiv	negativ	negativ	negativ
1005908	250 g	10 g	positiv	negativ	negativ	negativ
Honig aus Kanada		10 g	positiv	positiv	positiv	positiv

© LfU/ReferatZ/Dr. ReinhardZ/01ed/2003

Honigproben

Bayerisches Landesamt
für Umweltschutz

Nachweis transgener Rapspollen

- Es wird angenommen, dass beim Anbau von transgenem Raps unter landwirtschaftlichen Praxisbedingungen transgener Rapspollen weiträumig verteilt wird.
- Transgener Rapspollen kann durch konventionelle Pollenmonitoringkonzepte gesammelt werden (PMF-Sammler)
- Die Etablierung einer molekulargenetischen Analytik für den Nachweis transgener Pollen wird als realistisch eingeschätzt.



**Daten aus dem Rapspollen-Monitoring
könnten als Parameter
für ein Langzeitmonitoring verwendet werden.**

© LfU/ReferatZ/Dr. ReinhardZ/01ed/2003

PCR-Pollenanalytik

Bayerisches Landesamt
für Umweltschutz

Analytik von transgenen Rapspollen

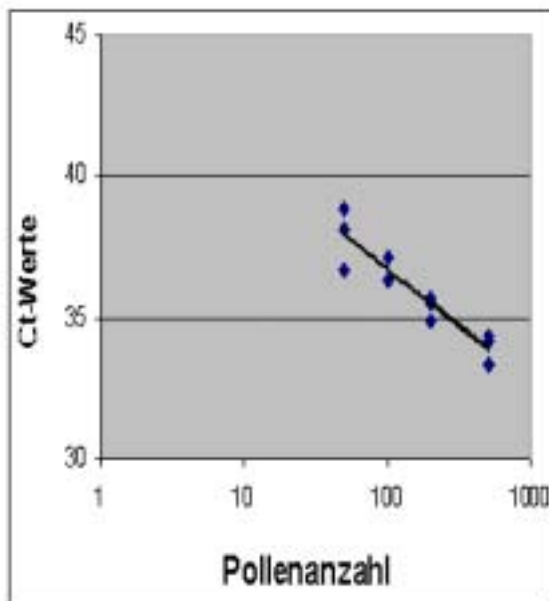
Entwickler

- Genescan AG
Hanseanalytik GmbH
Bremen
- Gentechnisches
Überwachungslabor am
Bayerisches Landesamt für
Umweltschutz, Augsburg

Konzeption

1. Nachweisreaktionen für
transgene Raps-DNA
2. Anwendung der
Nachweisreaktionen zur Analytik
transgener Rapspollen
3. Anwendung der
Nachweisreaktionen zur Analytik
transgener Rapspollen auf
Trägermatrizes von
Pollensammlern

Nachweis pat-transgener Pollen



- Rapspollen aus der Freisetzung
Sicke (Niedersachsen, 2001, RKI-
Az.: 6786-01-101)
- DNA-Isolierung nach der
Hair&Nails Methode von Qiagen
- Nachweis des *pat*-Gens durch
TaqMan-PCR
- Messungen von 3 unabhängigen
Pollensuspensionen

Zusammenfassung

1. Die PCR-Routineanalytik ermöglicht den spezifischen und empfindlichen Nachweis transgener Raps-DNA
2. Verwilderte transgene Rapspflanzen können in der Umwelt mit dem am LfU entwickelten Konzept aufgespürt und nachgewiesen werden.
3. Blattmischproben sind für die PCR-Routineanalytik sehr gut geeignet.
4. Die Einsatzmöglichkeiten von biologischen (Honig) oder technischen Pollensammlermethoden müssen weiter geprüft werden.

Dr. Reinhard Zeitler

Bayerisches Landesamt für Umweltschutz
86177 Augsburg

Tel.: (0821) 90 71 – 51 23

Fax: (0821) 90 71 – 50 09

reinhard.zeitler@lfu.bayern.de