

GMO Screening in Saatgut - 8 aus 53? GMO screening in seeds - 8 out of 53?

Andreas Firzinger^{1*}

Abstract

Since 2001 Austrian authorities perform a monitoring of seeds of certain plants for their content of genetically modified organisms (GMO). Technical specifications for sampling of seeds and methods for detection of GMOs are defined in official policies and guidelines. The permanent monitoring should keep the GMO contamination of seeds below a limit of 0.1%, which is the limit for labelling seeds as GMOs. Laboratories performing GMO screening in seeds should be able to detect one approved or not approved transgenic seed among 3000 other not genetically modified seeds with a probability of 95%. In 2001 about 20 transgenic maize lines were registered worldwide and by screening for two DNA sequences all of them could be detected. Nowadays, more than 50 transgenic maize lines are registered and a screening of four DNA sequences is necessary to detect all transgenic maize varieties. Besides maize several other plant species are included in the policy for labelling of transgenic seeds, i.e. soybean, Polish and Argentine canola, tomato, potato and chicory. All or a combination of the following DNA sequences should be detected in a GMO screening of seeds: CaMV 35S promotor, *Nos*-promotor, *Nos*-terminator, *PAT* genes from *Streptomyces viridochromogenes* and *S. hygroscopicus*, and the *CP4 EPSPS* gene. Additionally, several event-specific PCR methods should be applied, which detect only a single transgenic plant, because some transgenics do not contain any of the above mentioned DNA sequences. The number of approvals for transgenic plants rises continuously and so does the number of DNA sequences, which have to be detected for an efficient GMO screening.

Keywords

Genetic engineering, genetically modified organism, labelling, screening, transgenic seeds

Einleitung

Im Jahr 2001 wurde in Österreich die Saatgut-Gentechnik-Verordnung (BGBl. II Nr. 478/2001) erlassen. Mit dieser Verordnung wurde erstmals festgelegt, dass Saatgut, welches nicht gentechnisch verändert ist, in der Erstuntersuchung mit GMO-Saatgut nicht verunreinigt sein darf. In einer Nachkontrolle der Saatgutverkehrskontrolle darf GMO-Saatgut bis zu 0,1% in nicht gentechnisch verändertem Saatgut vorkommen. Zum Zeitpunkt des Erlasses der

Verordnung waren knapp über 20 gentechnisch veränderte Maislinien zugelassen. Zehn Jahre später, Ende 2011, sind bereits mehr als 50 Maislinien zugelassen. Während damals die Detektion von lediglich zwei DNA-Sequenzen notwendig war, um das Vorhandensein einer GMO-Maislinie in Maissaatgut nachzuweisen bzw. auszuschließen, hat sich bis Ende 2011 nicht nur die Zahl der zugelassenen GMOs sondern auch die Zahl der zu detektierenden DNA-Sequenzen erhöht um ein umfassendes GMO-Screening in Mais zu gewährleisten. Die Saatgut-Gentechnik-Verordnung betrifft neben Mais seit 2011 noch weitere 8 Arten: Kohlrübe (*Brassica napus* L. var. *napobrassica*), Raps (*B. napus* L.), Rübsen (*B. rapa* L.), Stoppel-, Herbst-, Mairübe (*B. rapa* L. var. *rapa*), Sojabohne (*Glycine max* (L.) Merr.), Tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) als Verarbeitungssorten, Zichorie (*Cichorium intybus* L.), Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) (BGBl. II Nr. 76/2011) (BUNDESKANZLERAMT 2012a).

Material und Methoden

Probenvorbereitung und -beschaffenheit

Für alle in der Saatgut-Gentechnik-Verordnung erwähnten Arten gelten die gleichen Anforderungen an die Probenvorbereitung und Untersuchungsmethodik, welche in den Methoden für Saatgut und Sorten gemäß § 5 Saatgutgesetz 1997 festgelegt sind (BUNDESKANZLERAMT 2012b). Bei der Probenvorbereitung ist darauf zu achten, dass die Saatgutbehandlung (z.B. Beizung, Inkrustierung, Pillierung) und äußere Verunreinigungen der Samen, welche das Ergebnis der Untersuchung von Saatgut auf Verunreinigungen mit zugelassenen und nicht zugelassenen GMO beeinflussen könnten, auszuschließen sind. So kann z.B. Stärke, welche bei Beizmitteln eingesetzt wird, aus GMO-Mais gewonnen worden sein und würde in diesem Fall zu einem positiven Ergebnis im GMO-Screening führen, obwohl das Saatgut selbst keine GMOs enthält. Die Arbeitsprobe im Labor muss zumindest 3000 Samen umfassen und die Untersuchungsmethodik und der Untersuchungsplan müssen so ausgelegt sein, dass ein gentechnisch veränderter Same unter 3000 nicht gentechnisch veränderten Samen mit einer 95%igen Sicherheit nachgewiesen werden kann (BUNDESAMT FÜR ERNÄHRUNGSSICHERHEIT 2010). Eine Ausnahme bildet hier das Kartoffelsaatgut, schon alleine aufgrund der Größe des Pflanzguts. Bei der Kartoffel muss die Arbeitsprobe im Labor zumindest 200 Knollen umfassen (BUNDESAMT FÜR ERNÄHRUNGSSICHERHEIT 2011).

¹ Romer Labs Diagnostic GmbH, Technopark 1, A-3430 TULLN

* Ansprechpartner: Andreas FIRZINGER, andreas.firzinger@romerlabs.com



Methoden

Bei der Auswahl der Methodik hat sich die Untersuchung der DNA der Arbeitsprobe mittels PCR als am besten geeignet herausgestellt. Methoden, die auf der Untersuchung von transgenen Proteinen basieren, sind aus verschiedenen Gründen zu wenig sensitiv. Während sich zum Beispiel der DNA-Gehalt bei Saatgut bei längerer Lagerung kaum verändert, werden Proteine in den Zellen entweder abgebaut oder nicht exprimiert, da sich der Same bis zur Keimung in einem Ruhestadium befindet und der Stoffwechsel auf ein absolutes Minimum reduziert ist. Außerdem sind einige der gesuchten GMOs in der Zusammensetzung des Proteoms von anderen, nicht modifizierten Organismen der gleichen Spezies nicht oder nur unter großem apparativem Aufwand unterscheidbar. Wie viele und welche DNA-Sequenzen beim Screening nach zugelassenen und nicht zugelassenen GMOs erfasst werden, sodass den Anforderungen der österreichischen Saatgut-Gentechnik-Verordnung entsprochen wird, ist von Art zu Art unterschiedlich. Viele der eingesetzten PCR-Methoden sind auf der Homepage des European Union Reference Laboratory for GM Food & Feed (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/>) publiziert.

Mais

Von den mehr als 140 GMOs in der Datenbank des amerikanischen Center for Environmental Risk Assessment stellen die GMO-Maislinien den größten Anteil dar. Ende 2011 waren insgesamt 54 Maislinien in den Datenbanken registriert (CERA 2011, FORUM BIO- UND GENTECHNOLOGIE 2011). Einen Großteil dieser Linien kann man durch Detektion des 35S-Promotors aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) und des *Nos*-Terminators aus *Agrobacterium tumefaciens* erfassen (Tabelle 1). Vier der nicht erfassten Maislinien sind aus somaklonalen Mutationen hervorgegangen und würden in Österreich nicht als GMOs gelten. Die verbleibenden zwei nicht erfassten Maislinien DP-Ø9814Ø-6 (Event 98140) und REN-ØØØ38-3 (LY038) müssen mit jeweils einer PCR-Methode detektiert werden. Somit werden durch Detektion von insgesamt 4 DNA-Sequenzen alle bis 2011 bekannten GMO-Maislinien, exklusive der durch somaklonale Mutation gezüchteten Sorten, erfasst.

Raps, Kohlrübe, Rübsen, Stoppel-, Herbst- und Mairübe

Obwohl Raps, Rübsen und Rüben in der Saatgut-Gentechnik-Verordnung getrennt geführt werden, kann man diese Arten bei Überlegungen zum GMO-Screening zusammenfassen. Zwanzig Linien sind in Datenbanken (CERA 2011, FORUM BIO- UND GENTECHNOLOGIE 2011) registriert, davon auch insgesamt drei, die mittels Mutagenese und somaklonaler Mutation gezüchtet wurden. Für ein GMO-Screening in diesen Arten ist die Detektion von 5 DNA-Sequenzen notwendig: 35S-Promotor, *Nos*-Promotor aus *A. tumefaciens*, die Gene für Phosphinothricin N-Acetyltransferase aus *Streptomyces hygroscopicus* (*bar*) und *S. viridochromogenes* (*pat*) und das Gen für 5-Enolpyruvyl Shikimat-3-Phosphat Synthase aus *A. tumefaciens* CP4 (*CP4 EPSPS*) (Tabelle 1). Alle diese Arten gehören zur Familie der *Brassicaceae* und

sind relativ häufig mit dem Blumenkohlmosaikvirus infiziert. Da der 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus stammt, führt die Detektion des 35S-Promotors einer mit diesem Virus infizierten Pflanze zu einem positiven Screeningergebnis, das aber erst durch weitere Untersuchungen bestätigt oder entkräftet werden kann. Ein falsch positives Screeningergebnis ist erst dann ein solches, wenn andere DNA-Sequenzen des Blumenkohlmosaikvirus in der Probe nachgewiesen und all jene GMO-Linien, die den 35S-Promotor enthalten, nicht nachgewiesen werden konnten.

Sojabohne

Im Jahr 1994 wurde in den USA die erste GMO-Sojalinie zugelassen, GTS 40-3-2 von Monsanto, besser bekannt unter dem Namen Roundup Ready® Sojabohne. Diese Sojalinie war kommerziell mindestens ebenso erfolgreich, wie das Betriebssystem Windows auf dem Softwaremarkt. Über viele Jahre hinweg dominierte die Roundup Ready® Sojabohne den Weltmarkt im GMO-Soja Bereich. Dies ist vielleicht der Grund dafür, dass bis Ende 2011 lediglich 17 GMO-Sojalinien (CERA 2011, FORUM BIO- UND GENTECHNOLOGIE 2011) zugelassen oder zur Zulassung eingereicht wurden. Ein noch ausreichendes GMO-Screening in Soja-saatgut ist durch Detektion der folgenden DNA-Sequenzen möglich: 35S-Promotor, *CP4 EPSPS* Gen, BPS-CV127-9 Soja, DP-305423 Soja, DP-356043 Soja (Tabelle 1). Die letzten 3 Methoden detektieren jeweils nur eine Sojalinie, es handelt sich hierbei um sogenannte Event-spezifische Methoden, mit welchen immer nur genau eine einzelne GMO-Linie detektiert werden kann. Bei Soja zeigt sich der Trend am deutlichsten, dass neuere GMO-Linien keine gemeinsamen transgenen Elemente mehr haben, weshalb für jede einzelne Linie ein eigenes PCR Verfahren entwickelt werden muss. Von 4 weiteren in der Zulassung stehenden GMO-Sojalinien ist für jede ein eigenes PCR-Verfahren zur Detektion nötig.

Kartoffel

In den USA wurde die erste gentechnische Kartoffel im Jahr 1994 zugelassen (CERA 2011), elf Jahre später wurde von BASF ein Antrag zur Zulassung einer gentechnisch veränderten Kartoffel mit veränderter Stärkezusammensetzung in Europa eingereicht. Nachdem der Anbau dieser Kartoffel 2010 erlaubt wurde, verkündete BASF kürzlich, die Entwicklung und Vermarktung gentechnisch veränderter Pflanzen, die hauptsächlich auf den europäischen Markt abzielen, einzustellen und sich auf die Wachstumsmärkte außerhalb Europas zu konzentrieren (BASF 2012), was letztlich das Ende des Anbaues dieser Kartoffel in Europa bedeutet. Für ein GMO-Screening in Kartoffelsaatgut bleibt die Amflora Kartoffel trotzdem relevant, wie auch sechs weitere Linien (CERA 2011, FORUM BIO- UND GENTECHNOLOGIE 2011). Um alle diese Kartoffellinien zu erfassen, muss man mindestens zwei DNA-Sequenzen detektieren: 35S-Promotor und *Nos*-Terminator (Tabelle 1). Eine PCR-Methode zur Detektion der AM1020-4 Kartoffel, welche weder den 35S-Promotor noch den *Nos*-Terminator enthält, wurde bereits von Laboratorien der EU Kommission validiert und wird in Bälde publiziert. Ab der Publikation des Verfahrens muss dieses ebenfalls beim Screening angewandt

werden. Die Probengröße bei der Kartoffel wurde auf 200 verringert, wobei eine Laborprobe dieser Größe immer noch eine Herausforderung bezüglich Probenvorbereitung darstellt. Dazu kommt noch, dass Kartoffelpflanzgut mit Bodenbakterien behaftet sein kann, welche zu falsch positiven Ergebnissen im Screening führen können.

Tomate

Die Zahl der GMO-Tomatensorten hält sich in Grenzen, seit dem Jahr 2000 gibt es keine bekannten neuen Entwicklungen (CERA 2011). Somit sind seit dem Inkrafttreten der Saatgut-Gentechnik-Verordnung lediglich zwei DNA-Sequenzen für ein GMO-Screening zu detektieren: 35S-Promotor und *Nos*-Promotor (Tabelle 1). Damals, wie heute, ist die erforderliche Anzahl an Samen für die Untersuchung ein Kostenhindernis für den Antragsteller, da ein Tomatensamen ungleich wertvoller ist, als z.B. eine Sojabohne.

Zichorie

Eine GM-Zichoriensorte (RM3-3, RM3-4, RM3-6 zugelassen 1996 in der EU und 1997 in den USA) wurde bisher zugelassen. Weitere Anträge zur Zulassung von GM-Zichoriepflanzen wurden in den OECD-Staaten nicht eingereicht (CERA 2011, FORUM BIO- UND GENTECHNOLOGIE 2011). Um diese Pflanze zu detektieren ist somit nur eine von mehreren PCR-Methoden notwendig: *Nos*-Terminator oder *Nos*-Promotor (Tabelle 1).

Weizen und Zuckerrübe

Das Saatgut beider Arten wird von der Saatgut-Gentechnik-Verordnung nicht berührt und es wird, wie aus dem jährlichen GVO-Monitoring Bericht (LEONHARDT et al. 2010) hervorgeht, bezüglich GMO nicht von staatlichen Institutionen überwacht. Dennoch sollen die Arten der Vollständigkeit halber erwähnt werden. In der CERA-Datenbank sind insgesamt 7 GM-Weizenlinien registriert (CERA

2011), aber nur eine davon ist tatsächlich transgen. Alle anderen Weizenlinien wurden durch Selektion gezüchtet und sind resistent gegen Imidazol. Die verbleibende GM-Weizenlinie MON71800 kann wie schon zuvor die Zichorie durch Anwendung einer von mehreren PCR-Methoden nachgewiesen werden: 35S-Promotor, *Nos*-Terminator oder *CP4 EPSPS* (Tabelle 1). Bei der Zuckerrübe sind alle 4 in den Datenbanken registrierten GM-Linien auch transgen (CERA 2011, FORUM BIO- UND GENTECHNOLOGIE 2011). Mit der Detektion von zwei DNA-Sequenzen wäre ein GMO-Screening möglich: 35S-Promotor und *CP4 EPSPS* (Tabelle 1).

Ausblick

Die Zahl der neu entwickelten GMOs ist, vor allem außerhalb Europas, im Steigen begriffen, auch wenn die Zulassung einiger GMOs mittlerweile abgelaufen ist und nicht mehr verlängert wurde. In einem GMO-Screening müssen auch solche GMOs erfasst werden, die schon seit Jahren nicht mehr angebaut oder vermarktet werden, wie sich im Lebensmittelbereich im Falle der FP967 Leinsaatlinie (CDC-FLØØ1-2) gezeigt hat. Obwohl der Anbau in Kanada im Jahr 2001 eingestellt wurde um den Exportmarkt in die EU nicht zu gefährden, tauchten im Jahr 2009 einige Leinsaatlieferungen in Europa auf, die Kontaminationen mit eben jener GMO-Leinsaat enthielten. Dies wurde manchmal erst bemerkt, als diverse Endprodukte, wie z.B. Backwaren, im Rahmen der Qualitätskontrolle auf GMOs hin untersucht wurden. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde aus Kanada importierte Leinsaat nicht auf GMO-Kontaminationen hin untersucht.

Bei neu entwickelten GMOs zeigt sich der Trend, dass bisher eingesetzte PCR-Methoden (Tabelle 1) für ein Screening nicht mehr ausreichend sind, da die GMOs oft vollkommen neue Regulationssequenzen und Transgene beinhalten und Selektionsmarker, wie z.B. Herbizidresistenzen, durch Kreuzungen entfernt werden können (z.B. MON87701 und MON87708 Soja). Bei der Antragstellung muss der Produ-

Tabelle 1: Kulturarten und DNA-Sequenzen für GMO-Screening
Table 1: Plant species and DNA-sequences for GMO screening

Kulturart	DNA Sequenzen ¹						Eventspezifische Methoden	PCR-Methoden	GMO-Linien ²	
	35S-P	<i>Nos</i> -P	<i>Nos</i> -T	<i>CP4 EPSPS</i>	<i>bar</i>	<i>pat</i>			detektiert	nicht detektiert
Mais	×		×				LY038 DP98140	4	50	1
Soja	×			×			DP305423 DP356043 BPS CV127 9	5	11	6
Raps, Rübsen u.a. Brassicaceen	×	×		×	×	×		5	17	0
Kartoffel	×		×				AM04-1020	3	7	0
Tomate	×	×						2	6	0
Zichorie			×					1	1	0
Weizen	×							1	1	0
Zuckerrübe	×			×				2	4	0

¹ 35S-P: 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV); *Nos*-P: *Nos*-Promotor aus *Agrobacterium tumefaciens*; *Nos*-T: *Nos*-Terminator aus *A. tumefaciens*; *CP4 EPSPS*: 5-Enolpyruvyl Shikimat-3-Phosphat Synthase aus *A. tumefaciens* *CP4*; *bar*: Phosphinothricin N-Acetyltransferase aus *Streptomyces hygroscopicus*; *pat*: Phosphinothricin N-Acetyltransferase aus *S. viridochromogenes*

² nur tatsächliche transgene Linien berücksichtigt (keine Mutationslinien)

zent eine PCR-Methode zur Detektion des GMOs beilegen, jedoch sind diese Methoden nicht für ein Screening geeignet, da sie spezifisch sein müssen und keine anderen GMOs und Pflanzenlinien detektieren dürfen. Die Komplexität des GMO-Screenings im Saatgut wird zunehmen und die Zukunft wird immer neue Herausforderungen sowie überraschende Ergebnisse in der GMO-Analytik bereithalten.

Literatur

- BASF, 2012: BASF konzentriert Pflanzenbiotechnologie-Aktivitäten auf Hauptmärkte in Nord- und Südamerika. Presse-Information P109/12, 16. Jan 2012, BASF SE, Ludwigshafen [Internet: <http://www.basf.com/group/pressemitteilungen/P-12-109>; verifiziert 28 Jan 2012].
- BUNDESAMT FÜR ERNÄHRUNGSSICHERHEIT, 2010: Anforderungen an die Beschaffenheit und Methoden zur Bestimmung der Beschaffenheit von Saatgut. Amtliche Nachrichten 14/2010 [Internet: <http://www.baes.gv.at/amtliche-nachrichten/kundmachungen/saatgut-gesetz/>; verifiziert 28 Jan 2012].
- BUNDESAMT FÜR ERNÄHRUNGSSICHERHEIT, 2011: Normen und Verfahren zur Anerkennung von Kartoffelpflanzgut. Amtliche Nachrichten 13/2011 [Internet: <http://www.baes.gv.at/amtliche-nachrichten/kundmachungen/saatgutgesetz/>; verifiziert 28 Jan 2012].
- BUNDESKANZLERAMT, 2012a: Gesamte Rechtsvorschrift für Saatgut-Gentechnik-Verordnung. Bundeskanzleramt Rechtsinformationssystem [Internet: <http://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=20001731>; verifiziert 28 Jan 2012].
- BUNDESKANZLERAMT, 2012b: Gesamte Rechtsvorschrift für Saatgutgesetz 1997. Bundeskanzleramt Rechtsinformationssystem [Internet: <http://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=10011033>; verifiziert 28 Jan 2012].
- CERA, 2011: GM Crop Database. Center for Environmental Risk Assessment, International Life Sciences Institute Research Foundation, Washington DC. [Internet: http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database; verifiziert 31 Dec 2011].
- FORUM BIO- UND GENTECHNOLOGIE, 2011: Gentechnisch veränderte Pflanzen, Lebens- und Futtermittel: Zulassungen in der EU. TransGen Datenbank, Verein zur Förderung der gesellschaftlichen Diskussionskultur, Aachen [Internet: <http://www.transgen.de/zulassung/gvo/>; verifiziert 31 Dec 2011].
- LEONHARDT C, HARTMANN J, ZIMMERMANN H, HOCHEGGER R, 2010: Endbericht über das Monitoring einer möglichen Verunreinigung mit zugelassenen und nicht zugelassenen Gentechnisch Veränderten Organismen (GVO) gemäß GVO Überwachungs- und Monitoringplan bei Saatgut in der Saison 2009/2010. Bundesamt für Ernährungssicherheit, Wien [Internet: <http://www.baes.gv.at/saat-pflanzgut/gvo/monitoringberichte/>; verifiziert 28 Jan 2012].