

Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung
Department Pflanzenwissenschaften

**Entwicklung und Validierung von
qualitativen und quantitativen Nachweisverfahren
für gentechnisch veränderten Raps**

Annette Block

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. -Prof. Dr. J. Pfadenhauer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. Dr. G. Wenzel
2. Univ. -Prof. Dr. G. Forkmann

Die Dissertation wurde am 02.09.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt und am 09.12.2004 angenommen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. G. Wenzel danken für die Bereitstellung des Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit am Lehrstuhl unter ausgezeichneten Bedingungen durchführen zu können.

Herrn Dr. Gerhard Schwarz danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die gute wissenschaftliche Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft, die wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beitrugen, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Dr. F. Felsenstein möchte ich ausdrücklich für die Möglichkeit danken, die Räumlichkeiten und die gute technische Ausstattung der Epigene GmbH nutzen zu dürfen sowie für die Offenheit meinen Vorschlägen und Wünschen gegenüber. Herzlichen Dank auch an die wissenschaftlichen Mitarbeiter Frau S. Hasyn und Herrn B. Jaser sowie die gesamte Belegschaft der Epigene und Epilogic GmbH, die mich freundlich in ihre Arbeitsgruppe aufnahmen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Andrea Müller die mir als technische Assistentin zur Seite stand und durch ihre gewissenhafte Arbeit zum Erfolg der vorliegenden Dissertation beitrug.

Ferner gilt mein Dank den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe 'Molekulare Marker' am Lehrstuhl für Pflanzenbau und -züchtung, die durch ihre Kollegialität eine angenehme Arbeitsatmosphäre ermöglichten. Dies gilt besonders für Herrn Dr. V. Mohler, der mich in der Etablierung und Durchführung molekularbiologischer Techniken unterstützte. Für die gute Zusammenarbeit und die ambitionierten wissenschaftlichen Diskussionen bedanke ich mich bei Michael Dilger, Imad Zein, Stefan Bäumler und Tristan Funk.

An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Prof. Dr. A. Gierl und Frau Dr. M. Frei für die Möglichkeit danken, einige Versuche am Lehrstuhl für Genetik durchführen zu können.

Für die Analyse von Probenmaterial mit Hilfe vertraulicher, nicht publizierter Sequenzdaten danke ich Herrn Dr. R. Zeitler vom Landesamt für Umweltschutz in Augsburg.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich herzlich für ihre Hilfsbereitschaft, ihr Verständnis und die moralische Unterstützung.

Diese Arbeit wurde durch das Bayerische Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz finanziert.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Gentechnisch veränderte Pflanzen	2
1.1.1	Wirtschaftliche Bedeutung	2
1.1.2	Internationaler Handel	4
1.1.3	Gesetzliche Reglementierungen	4
1.2	Herbizidtoleranter Raps	7
1.2.1	Spenderorganismus Raps	8
1.2.2	PAT-Toleranz	8
1.2.3	EPSPS-Toleranz	9
1.3	Biotechnologische Nachweissysteme	10
1.3.1	Biotest	10
1.3.2	Immunologische Analysen	10
1.3.3	Chromatographie	12
1.3.4	Nah-Infrarotspektroskopie	13
1.3.5	DNA-Analysen	13
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Material	19
2.1.1	Verbrauchsmaterial und Chemikalien	19
2.1.2	Basislösungen	20
2.1.3	DNA-Molekulargewichts- und -Längenstandards	21
2.1.4	Enzyme	22
2.1.5	Oligonukleotide	23
2.1.6	Pflanzenmaterial	24
2.2	Methoden	27
2.2.1	Feldprobennahme	27
2.2.2	Aufarbeitung der Feldproben	28
2.2.3	DNA-Isolation	28
2.2.4	DNA-Quantifikation	29
2.2.5	Sequenzanalyse	30
2.2.6	RFLP-Analyse	31
2.2.7	Rekombinante DNA-Techniken	33
2.2.8	Qualitative PCR	34
2.2.9	Quantitative Real Time PCR	35

3	ERGEBNISSE	43
3.1	Entwicklung molekularer Nachweissysteme für LibertyLink® Raps	43
3.1.1	Spezifischer Nachweis von <i>Brassica</i> Strukturgenen.....	43
3.1.2	Allgemeiner Nachweis transgener DNA-Sequenzen.....	50
3.1.3	Spezifischer Nachweis des <i>pat</i> -Transgens	53
3.1.4	Spezifischer Nachweis des LibertyLink® Konstruktes	54
3.2	Validierung der molekularen Nachweissysteme für LibertyLink® Raps.....	57
3.2.1	Qualitative PCR-Nachweissysteme	58
3.2.2	Quantitative Real Time PCR-Nachweissysteme	60
3.3	Persistenz von transgenem Raps auf bayerischen Agrarflächen	71
3.3.1	Beschreibung der untersuchten Agrarflächen	71
3.3.2	Quantifizierung der Transgenanteile	72
4	DISKUSSION	78
4.1	Molekulare Nachweisverfahren für gentechnisch veränderte Pflanzen	79
4.1.1	Spezifität von PCR-Nachweisverfahren in der Analytik von GVP.....	79
4.1.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in der PCR-Analytik	95
4.1.3	Kalibrierstandards in der PCR-Analytik	102
4.1.4	GVP-Mikrochips	107
4.2	Bestimmung der Persistenz transgener Eigenschaften in der Agrarumwelt.....	108
4.2.1	Persistenz von herbizidtolerantem Raps auf den untersuchten Agrarflächen...	108
4.2.2	Einflüsse auf die Persistenz transgener Eigenschaften von GVP.....	109
5	ZUSAMMENFASSUNG	115
6	LITERATURVERZEICHNIS	117

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1-1: Verteilung der globalen Anbaubereiche der GVP im Jahr 2003	3
Tabelle 2-1: Chemikalien und Agenzien	19
Tabelle 2-2: DNA-Molekulargewichts- bzw. DNA-Längenstandards	21
Tabelle 2-3: Enzyme	22
Tabelle 2-4: Oligonukleotide	23
Tabelle 2-5: Brassica-Species	24
Tabelle 3-1: Regressionsparameter verschiedener Real-Time PCR Kalibrierstandards	60
Tabelle 3-2: Präzision der Schätzung von LL-Konstrukt kopien für verschiedene Kalibrierstandards	63
Tabelle 3-3: Präzision der Schätzung von s_{gt} -Referenzkopien für H ₂ O-verdünnte Kalibrierstandards	64
Tabelle 3-4: Präzision der Schätzung von s_{gt} bzw. P-35S-Kopien für H ₂ O-verdünnte Kalibrierstandards	64
Tabelle 3-5: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen verschiedener Standards in der Real Time PCR	67
Tabelle 3-6: Wiederfindungsraten des quantitativen Nachweises von LibertyLink [®] -Raps für verschiedene Kalibrierstandards	68
Tabelle 3-7: Pflanzenbauliche Parameter der 'transgen kontaminierten' Agrarflächen	71
Tabelle 3-8: Bodenbearbeitung auf den 'transgen kontaminierten' Agrarflächen	71
Tabelle 3-9: Geschätzte LL-Transgenanteile von einzelnen Stichproben der 'transgen kontaminierten' Agrarflächen	74
Tabelle 3-10: Durchschnittliche LL-Transgenanteile der 'transgen kontaminierten' Agrarflächen	75
Tabelle 3-11: Durchschnittliche RR-Transgenanteile der 'transgen kontaminierten' Agrarflächen	75
Tabelle 4-1: Qualitative PCR Referenz Assays zum Nachweis pflanzlicher Struktur gene	80
Tabelle 4-2: Quantitative Real-Time PCR Referenz Assays zum Nachweis pflanzlicher Struktur gene	82
Tabelle 4-3: Vorkommen und Häufigkeit von Promotor-, Terminator- und Markersequenzen in GVP	84
Tabelle 4-4: Qualitative PCR-Screening Assays für den Nachweis von GVP-Regulations- bzw. Markersequenzen	85
Tabelle 4-5: Quantitative PCR-Screening Assays für den Nachweis von GVP-Regulations- bzw. Markersequenzen	86
Tabelle 4-6: Qualitative PCR Assays zum Nachweis transgener Fremd gene	89
Tabelle 4-7: Quantitative PCR Assays zum Nachweis transgener Fremd gene	89
Tabelle 4-8: Qualitative PCR Assays für den Konstrukt spezifischen GVP-Nachweis	90
Tabelle 4-9: Quantitative PCR Assays für den Konstrukt spezifischen GVP-Nachweis	91
Tabelle 4-10: Qualitative PCR Assays für den Event spezifischen GVP-Nachweis	93
Tabelle 4-11: Quantitative PCR Assays für den Event spezifischen GVP-Nachweis	93
Tabelle 4-12: Nachweisgrenzen für qualitative PCR Assays von GVP	96
Tabelle 4-13: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für GVP mit quantitativen PCR Assays	98
Tabelle 4-14: Zusammenstellung verschiedener NG und BG für den Real-Time PCR Assay des LibertyLink [®] Konstruktes	99
Tabelle 4-15: Theoretische Nachweisgrenzen für Kulturpflanzen	100

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1: Anteil der verschiedenen GVP an der globalen Anbaufläche des Jahres 2003	2
Abbildung 1-2: Anteil konventioneller und transgener Sorten an der globalen Anbaufläche des Jahres 2003 nach James (2003)	3
Abbildung 1-3: Enzymatische Inaktivierung von L-Phosphinothricin durch Acetylierung	9
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Funktionsweise von 5'→3'-Exonuklease-Sonden	16
Abbildung 2-1: Regionale Verteilung der fünf 'transgen kontaminierten' Agrarflächen in Bayern	27
Abbildung 3-1: RFLP-Analyse genomischer Raps-DNA mit einer <i>pepc3</i> -Gen spezifischen Sonde	44
Abbildung 3-2: Amplifikationsplots zur Kalibrierung des Real Time <i>pepc3</i> -Referenz PCR Assays	46
Abbildung 3-3: Positionierung von Primern und Sonde des Real Time <i>pepc3</i> -Referenz PCR Assays	45
Abbildung 3-4: Die Spezifität des qualitativen <i>s_gt</i> -Gen Referenz PCR Assays	47
Abbildung 3-5: RFLP-Analyse genomischer Raps-DNA mit einer <i>s_gt</i> -Gen spezifischen Sonde	48
Abbildung 3-6: Amplifikationsplots zur Kalibrierung des Real Time <i>s_gt</i> -TM-Referenz PCR Assays	49
Abbildung 3-7: Positionierung von Primern und Sonde des Real Time <i>s_gt</i> -TM-Referenz PCR Assays	48
Abbildung 3-8: Die Spezifität des qualitativen P-35S Screening PCR Assays mit integrierten Referenz PCR Assays	50
Abbildung 3-9: Sequenzvergleich der 35S-Promotorregion transgener Raps- und Maislinien	51
Abbildung 3-10: Positionierung von Primern und Sonde des Real Time P-35S Screening PCR Assays	52
Abbildung 3-11: Amplifikationsplots zur Kalibrierung des Real Time P-35S Screening PCR Assays	52
Abbildung 3-12: Die Spezifität des qualitativen <i>pat</i> -Strukturgen PCR Assays	53
Abbildung 3-13: RFLP-Analyse genomischer Raps-DNA mit einer <i>pat</i> -Gen spezifischen Sonde	53
Abbildung 3-14: Sequenzvergleich der P-35S/ <i>pat</i> -Übergangsregion transgener LibertyLink® Linien	54
Abbildung 3-15: Position von Primern und Sonde des Real Time LL-Konstrukt PCR Assays	55
Abbildung 3-16: Amplifikationsplots zur Kalibrierung des Real Time LL-Konstrukt PCR Assays	56
Abbildung 3-17: Evaluierung der Nachweisgrenze des qualitativen P-35S Screening PCR Assays	58
Abbildung 3-18: Evaluierung der Nachweisgrenze des qualitativen <i>pat</i> -Transgen PCR Assays	59
Abbildung 3-19: Ableitung der Bestimmungs- und Nachweisgrenzen über Vertrauensintervalle des quantitativen Nachweises des LL-Konstrukts	65
Abbildung 3-20: Ableitung der Bestimmungs- und Nachweisgrenzen über Vertrauensintervalle des quantitativen PCR-Nachweises des P-35S und des <i>s_gt</i> -Referenzgens	65
Abbildung 3-21: Wiederfindungsfunktionen des Real-Time PCR Assays für das LL-Konstrukt mit verschiedenen Kalibrierstandards	69
Abbildung 3-22: Wiederfindungsfunktion des Real-Time PCR Assays den P-35S mit verdünnten Kalibrierstandards	70
Abbildung 3-23: Veränderung des Anteils LibertyLink®-toleranter GVP auf den 'transgen kontaminierten' Agrarflächen	76
Abbildung 3-24: Veränderung des Anteils Roundup Ready®-toleranter GVP auf den 'transgen kontaminierten' Agrarflächen	76
Abbildung 4-1: Die Spezifität von PCR Systemen zum GVP-Nachweis	79

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Irrtumswahrscheinlichkeit
A	Adenin
ADH	Mais spezifischer Promotor für die Alkoholdehydrogenase 1
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>B.</i>	<i>Brassica</i>
b(p)	Basenpaare
BG	Bestimmungsgrenze
bidest	bidestilliert
bisteril	bidestilliert und autoklaviert
Bla	Betalactamase Gen, Antibiotikaresistenz-Gen (z.B. Penizillin, Ampicillin)
BnACCg8	<i>Brassica napus</i> Acetyl-CoA Carboxylase BnACCg8 aus Raps
BAR	Bialaphos Toleranz-Gen aus <i>Streptomyces hygrosopicus</i> gegen PPT
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
BSE	Bovine Spongiform Encephalopathy
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bt176	Insektentolerante Maissorte Maximizer [®] mit dem <i>CryIA(b)</i> -Gen
Bt11	Insektentolerante Maissorte YieldGard [®] mit dem <i>CryIA(b)</i> -Gen
B33	Knollen spezifischer Patatin-Promotor aus <i>Solanum tuberosum</i>
C	Cytosin
c	Centi ($\times 10^{-2}$)
CDPK	'Calcium dependent protein kinase'-Promotor
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CBH-351	Maissorte 'StarLink', tolerant gegen Phosphinothricin
Ci	Curie
CIP	'calf intestine alkaline phosphatase'
cpm	'counts per minute'
CRM	'Certified Reference Material', zertifizierte GVP-Referenz Mahlgut
<i>CryIA(b)</i>	synthetisches Delta-Endotoxin ursprünglich aus <i>Bacillus thuringiensis</i>
CTP	Cytidin-5'-triphosphat, Chloroplast Transit Peptide aus <i>Petunia hybrida</i>
CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromid
Ct	Threshold Cycle, Schnittpunkt der Baseline mit der Fluoreszenzkurve
C4-EPSPS	5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase des <i>Agrobacterium</i> C4
d	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat von Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin
dd	Dideoxynukleotid von Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil
DLL25	Maissorte GR [®] von DeKalb tolerant gegen Phosphinothricin
DNA	'deoxyribo nucleic acid' Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleotid
DPI ₃	Dihydrocyclopyrrolinodol-Tripeptides
dsDNA	'double stranded DNA', doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
Δ Ct	delta Ct (Differenz der Ct-Werte von Referenz- und Zielgen)
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit

EG	Europäische Gemeinschaft
EU	European Union
∫	Freiheitsgrade
E _m	Emissionsspektrum
EMBL	'European Molecular Biology Laboratory'
ELISA	'Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay'
EPSPS	5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase
<i>epsps</i>	Gen, das für die EPSPS kodiert
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Fraktile der F-Verteilung
FAM	6-Carboxyfluorescein
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FS	Antisense-Polygalakturonase aus <i>Lycopersicon esculentum</i>
G	Guanin
g	Fallbeschleunigung, Gramm
GA21	Maissorte Roundup Ready [®] , tolerant gegen Glyphosat
GÄ	Genomäquivalent
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTS 30-3-2	Sojasorte Roundup Ready [®] , tolerant gegen Glyphosat
GBSS	Körnchen bindende Stärkesynthase aus <i>Solanum tuberosum</i>
GenTG	deutsches Gentechnikgesetz
GLU-1D-1	Endosperm spezifischer Promotor
GV	gentechnisch verändert
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
GVP	gentechnisch veränderte Pflanze
GOX	Glyphosatoxidoreduktase
<i>gox</i>	Gen, das für GOX kodiert
GTS 40-3-2	Sojasorte Roundup Ready [®] , tolerant gegen Glyphosat
h	Stunde
Hm	Hoch mobile Region im Maisgenom
Hph	Hygromycin B Phosphotransferase aus <i>Escherichia coli</i>
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSP70	'heat shock' Protein aus <i>Zea mays</i>
Ivs2	Intron 2 des Alkoholdehydrogenase 1 Gens aus <i>Zea mays</i>
Ivr	Mais spezifische Invertase
k	relative Ergebnisunsicherheit der BG, Kilo ($\times 10^3$)
Le1	Soja-Lecitin 1
l	Liter
LL	LibertyLink [®] (Herbizidtoleranz gegen Phosphinothricin)
LMW-Glutenin	'low molecular weight' Gluteninge im Weizengenom
m	Milli ($\times 10^{-3}$); Meter; Anzahl der Wiederholungen pro Konzentrationsstufe
M	Mega ($\times 10^{-6}$), Mol, molar
μ	Mikro ($\times 10^{-6}$)
m-EPSPS	5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase aus <i>Zea mays</i>
MGB	'minor groove binder'-Sonde
min	Minute

N	normale
NIR	Nah-Infrarotspektroskopie
mol. biol. grade	Molecular Biology Grade
MON810	Insektentolerante Maissorte YieldGard [®] mit dem <i>CryIA(b)</i> -Gen
MON802	Insekten- und Glyphosat tolerante Maissorte mit dem <i>CryIA(b)</i> -Gen
MG-Standard	'gemischte genomische' Standards
Mio.	Millionen
MPG-Standard	'gemischte plasmidale & genomische' Standards
n	Nano ($\times 10^{-9}$)
<i>nptII</i>	Neomycinphosphotransferase II, Antibiotikaresistenz
<i>nptII</i> Tn5	siehe <i>nptII</i> auf Transposon 5
MS-Standard	'gemischter Samen' Standard
MSL	männlich sterile Linie
N_A	Avogadrokonstante
NaAc	Natriumacetat
NG	Nachweisgrenze
P	Phosphat
NTC	no template control, Leerwerte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAT	Phosphinothricin Acetyltransferase aus <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
Plant-1/2	spezifisches Primerpaar für eine DNA-Sequenz der Chloroplasten DNA
PCR	'polymerase chain reaction', Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenolpyruvat Carboxylase
PE3-PEPcase	Phosphoenolpyruvat Carboxylase 3
P-PEP-C	Mais-Promotor der Phosphoenolpyruvat Carboxylase
<i>PfU</i>	'proof reading' DNA-Polymerase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PNK	Polynukleotidkinase
PPT	Phosphinothricin, Glufosinat
P-r-act	Promotor aus Reis für Aktin
P-SsuAra	<i>Arabidopsis</i> -Promotor für die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase
pur	Puroindoline-b Gen von <i>Triticum durum</i>
PVY	Potato Virus Y
P-35S	Promotor des Cauliflower Mosaic Virus
R	Bestimmtheitsmass
<i>Rab1</i>	regulatorisches Protein im Weizensamen
Q_x	Summe der Abweichungsquadrate
<i>R.</i>	<i>Raphanus</i>
rel. VI	relatives Vertrauensintervall
R-Enzym	Restriktionsenzym
RFLP	'restriction fragment length polymorphisms'
Rn	Reportersignal, normalisiert mit Rox via SDS-Software (TaqMan [®])
RNA	'ribo nucleic acid', Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin

RR	Roundup Ready®
RT	Raumtemperatur
R^2	Korrelationskoeffizient
S.	<i>Sinapsis</i>
s^2	Varianz
s	Sekunde, Standardabweichung
S-GT	UDP-glucose:thiodroximate S-glycosyltransferase
SDS	'Sodiumdodecylsulfat', Natriumdodecylsulfat, Sequence Detection System
SNP	'single nucleotide polymorphism', Punktmutation
spec.	Species, Art
SSC	Natriumsulfonatcitrat
ssDNA	'single stranded DNA'
ZSSIIb	Stärkesynthase II aus Mais
SYBR Green	fluorogener Farbstoff
T	Tymin
TA29	entwicklungsspezifischer Promotor aus <i>Nicotiana tabacum</i>
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure (Tris-Acetat-EDTA)
TAMRA	N,N,N',N'-Tetramethyl-6-carboxyrhodamin
TBE	Tris-Borate-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylethylendiamin
Ti-Plasmid	Tumor-induzierendes Plasmid von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
TKG	Tausendkorngewicht
T_m	Schmelztemperatur
TM	Trade Mark
T-NOS	Terminator des Nopalinsynthase-Gens aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TR01/02	Primerpaar für ein hochrepetitives DNA-Segment im Weizengenom
TUM	Technische Universität München
T-35S	Terminator des Cauliflower Mosaic Virus
T14	Maissorte LibertyLink®, tolerant gegen Phosphinothricin T25
U	Unit
u.U.	unter Umständen
UV	ultraviolett
V	Volt, Variationskoeffizient
VIC	fluorogener Farbstoff unbekannter Struktur
VG-Standard	'verdünnte genomische' Standards
vgl.	vergleiche
VI	Vertrauensintervall
V_k	Variationskoeffizient
VP-Standard	'verdünnte plasmidale' Standards
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
W	Watt, Wiederfindungsrate
W_F	Wiederfindungsfunktion
x	Messwert
\bar{x}	Mittelwert
Zein	Mais spezifisches Speicherprotein

1 EINLEITUNG

Die Entwicklung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) im 'grünen' Agrarbereich und die Markteinführung von Lebensmittelprodukten, die sich von GVO ableiten, hat in der Öffentlichkeit verschiedenste Befürchtungen hervorgerufen. So hat der öffentliche Diskurs über die Sicherheit von GVO-haltigen Lebensmitteln Anforderungen an eine eindeutige Kennzeichnung hervorgebracht. Um dem 'Schutzziel' des Verbrauchers nachzukommen, haben die politischen Instanzen der verschiedenen Nationen das Risiko einer Freisetzung pflanzlicher GVO durch Reglementierungen beschränkt. Für Landwirtschaft und Lebensmittelindustrie besteht dagegen der Bedarf nach einer Rechtssicherheit im Umgang mit GVO. Innerhalb der Europäischen Gemeinschaft (EG) befinden sich die Rechtsvorschriften zur Zeit in Überarbeitung. Die Aufgabe unabhängiger und universitärer Forschungsinstitute ist die Bereitstellung detaillierter Informationen zur Beurteilung eventueller Risiken der 'neuen Technik'. Eine weitere Aufgabe ist die Vorstellung von Methoden zur effektiven Kontrolle möglicher Risiken. In Deutschland wurden zu diesem Zweck interdisziplinäre Forschungsprogramme auf Bundes- und Länderebene initiiert.

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Großprojektes, bei dem die Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, das Landesamt für Umweltschutz und die Technische Universität München (TUM) kooperieren. Das Ziel des Projektes ist die Durchführung eines 'Anbaubegleitenden Monitorings von gentechnisch veränderten Pflanzen (GVP) und die Methodenentwicklung für eine standardisierte Beurteilung ihrer Umweltwirkung'. Am Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der TUM wurde das Teilprojekt 'Bestimmung der Halbwertszeit transgener Kulturpflanzen in der Umwelt' bearbeitet.

Der Schwerpunkt dieser Dissertation war die Entwicklung und Validierung von molekularen Nachweisverfahren für gentechnisch veränderte Kulturpflanzen. Konkret sollte die Detektion von herbizidtolerantem, gentechnisch verändertem (GV-) Raps mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgen. Zur Bestimmung von GVP-Anteilen in Mischproben war die Entwicklung einer leistungsfähigen quantitativen PCR-Methode vorgesehen.

Im Anschluss sollten die PCR-Verfahren auf ihre Empfindlichkeit und Spezifität gegenüber verschiedenen GVP und konventionellen Genotypen evaluiert werden. In Hinsicht auf die aktuelle Gesetzeslage über GVP-Beimischungen in Lebens- und Futtermitteln war die Angabe der Methodenempfindlichkeit in Form von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ein besonderes Ziel der vorliegenden Arbeit. Schließlich sollten die entwickelten PCR-Verfahren zur Quantifizierung von Raps-Mischproben aus Praxisproben eingesetzt werden.

1.1 Gentechnisch veränderte Pflanzen

Mit Hilfe der Gentechnik können transgene Pflanzen mit Eigenschaften erzeugt werden, die über natürliche Vererbungsprozesse und Rekombinationsereignisse des genetischen Materials nicht entstehen könnten. Zu diesem Zweck werden die 'fremden' DNA-Sequenzen mit verschiedenen Transformationstechniken in das Genom der Wirtspflanze integriert.

Viele der biotechnologischen Veränderungen von Kulturpflanzen beziehen sich auf Krankheits- und Schädlingsresistenzen, Produktqualität, Toleranz gegenüber Umweltstress sowie zunehmend auch auf eine Veränderung des biochemischen Profils einer Pflanze. Weitere Ziele und Möglichkeiten bietet nach DALE et al. (1993) die Produktion spezieller Substanzen in GVO für die technische oder pharmazeutische Industrie.

Die bereits existierenden GVP besitzen Herbizidtoleranzgene gegen Glyphosat, Imidazolinon, Sulfonylharnstoff, Phosphinothricin (PPT) oder Bromoxynil (KERLAN et al. 1992; BROWN und BROWN 1996; KUIPER et al. 2002), haben eine Insektenresistenz oder Schwermetall-Toleranz erworben (RAYBOULD und GRAY 1994), verfügen über eine veränderte Fettsäurezusammensetzung (KNUTZON et al. 1992; FACCIOTTI et al. 1999), einen erhöhten Lauratgehalt (DEL VECCHIO 1996) sowie eine männliche Sterilität (MARIANI et al. 1990; MARIANI et al. 1992) oder sind befähigt Leukenkephalin zu produzieren (VANDEKERCKHOVE et al. 1989).

1.1.1 Wirtschaftliche Bedeutung

Die globale Anbaufläche von GVP stieg in den Jahren 1996 bis 2003 sprunghaft an. In einem Zeitraum von sieben Jahren vergrößerte sich die GVP-Anbaufläche um das 40fache von 1,7 Mio. auf 68 Mio. ha. Von den 18 Nationen, die im Jahr 2003 GVP kultivierten (Tabelle 1-1), fielen 42 Mio. ha der GVP-Anbaufläche auf die USA (63%), 14 Mio. ha auf Argentinien (21%), 4 Mio. ha auf Kanada (6%) sowie je 3 Mio. ha auf Brasilien und China (4%). Mit 41,4 Mio. ha und einem Anteil von 61% an der weltweiten GVP-Anbaufläche im Jahr 2003 hatte die Sojabohne die weitestgrößte Bedeutung. Ihr folgten Mais mit 15,5 Mio. ha Anbaufläche (23%), Baumwolle mit 7,2 Mio. ha (11%) und Raps mit 3,6 Mio. ha (5%). Kürbis und Papaya lagen

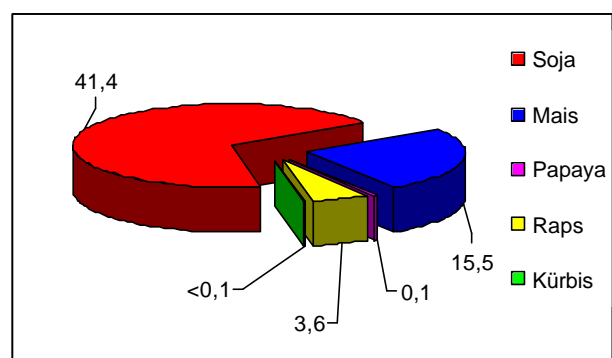


Abbildung 1-1: Anteil der verschiedenen GVP an der globalen Anbaufläche des Jahres 2003 nach JAMES (2003)

Tabelle 1-1: Verteilung der globalen Anbaugelände der GVP im Jahr 2003 nach JAMES (2003)

Nation	Mio. ha	%
USA	42,8	63
Argentinien	13,9	21
Kanada	4,4	6
Brasilien	3,0	4
China	2,8	4
Südafrika	0,4	1
Australien	0,1	<1
Indien	0,1	<1
Rumänien	<0,1	<1
Spanien	<0,1	<1
Mexiko	<0,1	<1
Bulgarien	<0,1	<1
Indonesien	<0,1	<1
Philippinen	<0,1	<1
Kolumbien	<0,1	<1
Honduras	<0,1	<1
Uruguay	<0,1	<1
Deutschland	<0,1	<1
gesamt	67,7	100

weit auf den Märkten gehandelt. Jährlich werden knapp 40 Mio. t Getreide, Ölsaaten und Futtermittel in die Europäische Union (EU) eingeführt. Der Anteil der GVP-Sorten am Anbauumfang der für die Lebensmittel- und Futterproduktion wichtigen Kulturarten Soja, Mais und Raps liegt in den Hauptanbauländern USA, Argentinien und Kanada heute bei über 20-50%. Nach VAN DUIN et al. (2002) lag der Anteil an transgenem Soja in den USA im Jahr 1999 bei über 50%, während er in Europa nur 0,1% betrug.

bei 0,1 Mio. ha Anbaufläche bzw. 1% (Abbildung 1-1). Abbildung 1-2 zeigt den Anteil konventioneller und transgener Sorten der vier wichtigsten Kulturarten Soja, Baumwolle, Raps und Mais an der globalen Anbaufläche.

Die wirtschaftlich bedeutendste und somit häufigste transgene Eigenschaft ist die Herbizidtoleranz. Ihr Anteil an der globalen GVP-Anbaufläche erreichte 77% im Jahr 2001, 2003 hingegen nur noch 50% (PAN 2002, JAMES 2003). Im Jahr 2003 hatten 12% aller GVP eine durch das *Bacillus thuringiensis* Gen vermittelt transgene Insektenresistenz. 6% der transgenen GVP trugen eine Herbizid- und Insektenresistenz und die restlichen 0,1% waren virustolerant oder hatten andere Eigenschaften (JAMES 2003). Ein Großteil dieser Agrarprodukte wird welt-

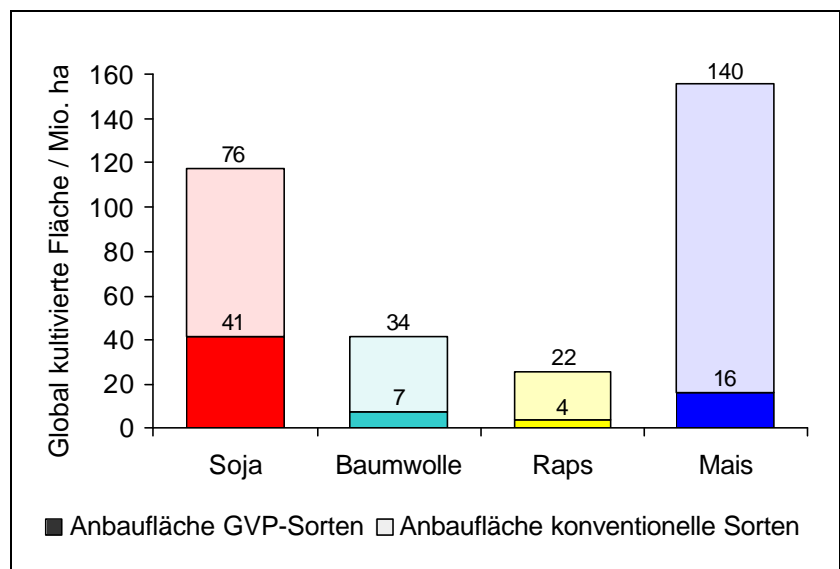


Abbildung 1-2: Anteil konventioneller und transgener Sorten an der globalen Anbaufläche des Jahres 2003 nach JAMES (2003)

1.1.2 Internationaler Handel

Da konventionelle und gentechnisch veränderte Ernteprodukte vor allem in den USA, Kanada und Argentinien bisher nicht voneinander getrennt und die Agrarrohstoffe gewöhnlich als Massenware gehandelt werden, ist bei ihrer Ankunft in Europa nur die Erfüllung der handelsüblichen Qualitätskriterien gesichert. Oft sind weder Herkunft noch enthaltene Sorten genau bekannt. So führten die unterschiedlichen Regelungen im Umgang mit GVO zu ernsthaften Problemen mit US-Importen in die EU (LEHRMAN 1999; WADMAN 1999; HASLBERGER 2000). Der GVP-Anteil der Importe entspricht nach SPRICK et al. (2003) etwa dem Anbauanteil gentechnisch veränderter Sorten im jeweiligen Exportland. Da noch keine international anerkannten Beprobungs- und Analysestrategien etabliert wurden, wird von unerwünschten GVP-Freisetzung aus verschiedenen Ländern berichtet (FOE 2000; KRUSZEWSKA 2000; NORRIE 2002). Spezielle Zertifizierungssysteme die eine Lieferung von GVP-haltiger Ware, getrennt von konventionellen Warenströmen, gewährleisten sollen, befinden sich im Aufbau. Dies erfordert jedoch einen hohen logistischen Aufwand und strenge Kontrollen auf allen Verarbeitungsstufen. Analoge Systeme wurden nach BROOKES et al. (2002) im Agrarbereich bereits für Rückstände von gefährlichen Mikroorganismen und die Rückverfolgung von BSE entwickelt.

1.1.3 Gesetzliche Reglementierungen

Die gesetzlichen Regelungen über transgene Kulturpflanzen befinden sich zur Zeit innerhalb der EU in Überarbeitung. Nach Einigung der EU-Gremien über neue gesetzliche Rahmenbedingungen zur Inverkehrbringung von GVP (BIOSICHERHEIT 2004a) wurden im April 2004 die neuen Regelungen für die Mitgliedsstaaten wirksam. Damit endete das seit Sommer 1999 verhängte De-facto-Moratorium für alle Anträge auf Vermarktung von GVP (BRANDT 2000; MITCHELL 2003). Nach HODGSON (1999) ist die Rechtssicherheit im GVP-Bereich, die Saatgutzüchter, -produzenten und die verarbeitende Industrie jahrelang vermissten, damit wieder hergestellt. Seit 1998 sind keine Zulassungen mehr erteilt worden (TRANSGEN 2002), so dass die Anträge auf Freisetzungsversuche von GVP vom Jahr 1998 bis 2002 von 254 auf ca. 33 zurückgingen (MITCHELL 2003). Die Genehmigungen zur 'absichtlichen Freisetzung von GVO in die Umwelt' (Part B-Zulassung) sowie die Zulassung von Futtermitteln, die aus GVO bestehen oder diese enthalten, wurden bisher entsprechend der Richtlinie 90/220/EC entschieden (HASLBERGER 2000). Die EU-Richtlinien wurden in Deutschland mit dem Gentechnikgesetz (GenTG, BIOLOGISCHE BUNDESANSTALT 1993) in nationales Recht transformiert.

Nach Übertragung der Kompetenzen des Robert-Koch-Institutes (RKI) auf das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) sind die nationalen Genehmigungsbehörden das BVL in enger Zusammenarbeit mit der 'Zentralen Kommission für Biologische Sicherheit' (ZKBS), der zuständigen Landesbehörde, der Biologischen Bundesanstalt (BBA), dem Bundesamt für Naturschutz (BfN) und der Kommission der EU-Mitgliedstaaten. Für die Zulassung GVP-haltiger Lebensmittel ist zukünftig das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) zuständig (BIOSICHERHEIT 2004b)

Neue EU-Richtlinien und EU-Behörden

Mit Inkrafttreten der Richtlinie 2001/18/EC (EUROPEAN COUNCIL 2001a) im Oktober 2002 wurde Richtlinie 90/220/EC (EUROPEAN COUNCIL 1990) aufgehoben. Die Regelungen der einzelstaatlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften zur Prüfung und Zulassung von gentechnisch veränderten Lebens- und Futtermitteln wurden damit EU-weit vereinheitlicht. Für Freisetzungsgenehmigungen von GVO ist nun die Zustimmung des Europäischen Parlaments sowie des EU-Ministerrates obligatorisch. In einer weiteren Richtlinie (EU 178/2002) wurde die Einführung einer 'Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit' (EFSA) zur Risikoabschätzung und zur Festlegung von Verfahren festgelegt (EG-KOMMISSION 2002). Die Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EC sieht eine stufenweise Einführung von GVP in die Umwelt vor. Praktisch beinhaltet dieses Vorgehen eine fallspezifische, stufenweise, experimentelle Risikoabschätzung einer 'Part B-Zulassung' mit Labor-, Gewächshaus- und Freisetzungsversuchen. Wurden während dieser Phase keine Risikofaktoren deutlich, kann eine zunächst auf 10 Jahre befristete Erlaubnis zum kommerziellen Anbau erteilt werden (EUROPEAN COMMISSION 2001). Zur Erkennung unvorhersehbarer schädlicher Wirkungen der GVP auf die menschliche Gesundheit und Umwelt wird die 'Part C-Zulassung' von einem Langzeitmonitoring begleitet (SCHIEMANN 2000). Dieses 'Anbaubegleitende Monitoring' soll nach einer Mitteilung des UMWELTBUNDESAMTES (2000) auf Empfehlung des Sachverständigenrates für Umweltfragen sowohl allgemeine Umweltbeobachtungen als auch fallspezifische Beobachtungen beinhalten. Anträge für die Markteinführung von GVO müssen laut 2001/18/EC zukünftig bei der zuständigen nationalen Behörde des EU-Mitgliedstaates gestellt werden, bei dem diese als erstes eingeführt werden sollen. In Deutschland wurde dazu GenTG entsprechend der neuen EU-Richtlinien novelliert (BIOSICHERHEIT 2004c). Befürwortet der EU-Staat die Markteinführung vor der EU-Kommission und verlautet kein Einspruch der EFSA, kann das GVO-Produkt unter den geltenden Bestimmungen in die EU eingeführt werden. Bei Einsprüchen wird die Meinung der EU-'Scientific Committees' eingeholt. Für GVP-Saatgutzulassungen gilt Ent-

sprechendes nach der Richtlinie 98/95/EC, einer Novellierung des deutschen Saatgutverkehrsgesetzes (SCHIEMANN 2000). Im Rahmen des Zulassungsverfahrens der neuen Richtlinie 2001/18/EG wurden bereits 22 Anträge für das Inverkehrbringen eingereicht. Es handelt sich um Gesuche für Mais, Rapsöl, Zuckerrüben, Sojabohnen, Baumwolle, Reis und Futterrüben. Elf dieser Anträge sind auf Einfuhr und Verarbeitung beschränkt, die übrigen beantragen auch die Zulassung für den Anbau (TRANSGEN 2004a).

Kennzeichnung und Rückverfolgbarkeit

Bis vor kurzem war die Kennzeichnung genetisch veränderter Lebensmittel noch durch mehrere EU-Rechtsakte geregelt (EC 1139/98, EC 49/2000, EC 50/2000). Mit Inkrafttreten der neuen Richtlinien EC 1829/2003 und EC 1830/2003 im April 2004 wurden diese jedoch aufgehoben (LGL 2004). Ab diesem Zeitpunkt müssen alle Lebensmittel, Lebensmittelzutaten und Aromen die aus GVO hergestellt wurden, etikettiert werden, unabhängig von der Nachweisbarkeit der genetischen Veränderung (BFR 2003). Damit wurde das Nachweisprinzip, das mit Richtlinie EC 1139/98 bestand, aufgehoben. Mit Einführung von EC 1829/2003 wurde der Geltungsbereich der 'Novel Food' Verordnung (EC 258/97) auf Produktgruppen beschränkt, die nicht in den Anwendungsbereich der Gentechnik fallen (LGL 2004). Entsprechend des Vorschlages EC 2001/0173 (EG-KOMMISSION 2001) erfolgte mit der Einführung von EC 1829/2003 eine Ausweitung der Kennzeichnungspflicht auf alle aus GVO hergestellten Futtermittel und -zutaten (LGL 2004). Mit der Richtlinie EC 1830/2003 wurden Regelungen für die Rückverfolgung von GVO, zum GVO-Monitoring und für Umweltverträglichkeitsprüfungen vorgenommen (TRANSGEN 2004). Diese Regelungen lagen dem Vorschlag 2001/0180/EC der Europäischen Kommission zugrunde (EUROPEAN COUNCIL 2001b). Sie haben das Ziel, bei Auftreten unerwarteter negativer Auswirkungen eine Rücknahme von aus GVO hergestellten Lebens- und Futtermitteln vom EU-Markt zu erleichtern (BFR 2003).

Die lückenlose Rückverfolgung von GVO und deren Verarbeitungsprodukten setzt geeignete, den Warenstrom begleitende, Informations- und Dokumentationssysteme voraus. Zu diesem Zweck ist im Rahmen der Richtlinie EC 1830/2003 die Entwicklung und Zuteilung spezifischer Erkennungsmarker für jeden GVO vorgesehen. Das Format für die GVO-Identifizierung ist in der Verordnung EC 65/2004 detailliert geregelt. Auf Grundlage einer numerischen Kodierung mit drei Komponenten, die Aufschluss über den Antragsteller, die Zulassung und das Transformationsereignis geben, soll eine GVO-Identifizierung erfolgen.

Zulassungen neuer GVP-Sorten und ihre Aufnahme in den 'Gemeinsamen Sortenkatalog für landwirtschaftliche Pflanzenarten' erfolgen innerhalb der EU nach der Richtlinie 2001/18/EC.

Bevor die zugelassenen GVP-Sorten in der EU vermarktet werden dürfen, müssen sie entsprechend der Richtlinie 98/95/EC deutlich gekennzeichnet sein (TRANSGEN 2004b).

Schwellenwerte für GVP und deren Verarbeitungsprodukte

Infolge zufälliger oder unvermeidbarer Kontaminationen bei Anbau, Ernte, Transport und Verarbeitung können GVP oder deren Produkte in geringen Spuren in konventionellen Lebens- oder Futtermitteln vorkommen. Die ersten Länder, die einen Grenzwert zur Kennzeichnung festgelegt haben, waren nach MEYER (1999) die Nicht-EU-Staaten Norwegen mit 2% und die Schweiz mit 1%. Australien, Brasilien, Neuseeland, Polen, Tschechien und Ungarn setzten die Schwelle bei einem GVP-Anteil von 1%, Südkorea bei 3%, Japan und Taiwan bei 5% fest (RUTH 2003). In den meisten osteuropäischen Ländern wie Kroatien, Georgien, Russland und der Ukraine gibt es noch keine gesetzlichen Regelungen über die Handhabung von GVP (KRUSZEWKA 2000). Ende 2003 wurde in der EU ein neues Gesetz zur Ablösung der 'Novel Food' Verordnung (EUROPEAN COUNCIL 1997) für GVO-haltige 'neuartige Lebensmittel' rechtskräftig. Der Rat der EU-Agrarminister, das EU-Parlament und die EU-Kommission haben sich im Juli 2003 auf einen Schwellenwert von 0,9% für zufällige, unvermeidbare GVP-Beimischungen in Lebens- und Futtermittelzutaten geeingigt (BUNDESMINISTERIUM FÜR GESUNDHEIT UND FRAUEN 2003). Keine Zutat, die durch den Gebrauch von GVP zur Lebens- oder Futtermittelproduktion entstanden ist, darf diesen Schwellenwert überschreiten (RAMÓN et al. 2004). Von der Regelung nicht betroffen sind Fleisch-, Milch-, und Eiprodukte von Tieren, die gentechnisch veränderte Futtermittel erhalten haben. Der Schwellenwert von 0,9% gilt nur für in der EU genehmigte GVP. Nicht in der EU genehmigte, aber als unbedenklich eingestufte GVP können nach RUTH (2003) bis zu einem Schwellenwert von 0,5% eingeführt werden. Auch der Begriff 'Gentechnikfreiheit' von Nahrungs-, Futtermitteln und Saatgut wurde genau definiert (POWELL und OWEN 2002). Über Schwellenwerte für Saatgut wurde derzeit noch nicht entschieden. Die EU-Kommission diskutiert Schwellenwerte von 0,3 - 0,7% je nach Pflanzenart (BIO SICHERHEIT 2003), womit sie zwischen den Forderungen von Pflanzenzüchtern (1,0%) und Ökoverbänden (0 - 0,1%) stehen. Je niedriger die Schwellenwerte gesetzt werden, desto aufwändiger und kostspieliger wird die Produktion von GVP-Saatgut und transgenen Pflanzen für Züchter und Landwirte.

1.2 Herbizidtoleranter Raps

Raps gehört zusammen mit Mais und Zuckerrüben zu den Kulturpflanzen, die in Europa am häufigsten als GVP in Freisetzungsexperimenten getestet wurden. Auch unter den nach der EU-Richtlinie 90/220/EC inverkehrgebrachten oder zum Inverkehrbringen beantragten GVP

steht Raps mit an erster Stelle. Nach Berichten der BIOLOGISCHEN BUNDESANSTALT (2003) umfassen die transgenen Eigenschaften vor allem Herbizidtoleranz, männliche Sterilität und veränderte Ölzusammensetzung. Da ca. 80-90% der Rapsanbaufläche in Deutschland mit Herbiziden behandelt werden, hat die Herbizidtoleranz eine starke Bedeutung.

1.2.1 Spenderorganismus Raps

Brassica napus gehört in die große Familie der *Brassicaceae*, die in Europa mit ca. 150 Arten viele Vertreter aufweist. Die Kulturpflanze ist ein amphidiploider Arthybride ($n = 19$, AC-Genom) aus einer Kreuzung von *B. oleracea*, dem Kohl ($n = 9$, C-Genom) und *B. rapa* ($n = 10$, A-Genom), dem Rübsen. Als Arthybride aus eng verwandten, kreuzungskompatiblen Arten besitzt *Brassica napus* nach U (1934) homologe Chromosomenbereiche bzw. Gene, die sowohl im A- als auch im C-Genom vorkommen. Als Entstehungszentrum von *B. napus* wird der europäische Raum angenommen, in dem Raps auch heute noch kreuzungskompatible Verwandte (Sympatrie) besitzt. Im Befruchtungsmodus zeigt Raps Protogynie und einen 12-47%igen Anteil an Allogamie (BECKER et al. 1992).

1.2.2 PAT-Toleranz

Der Wirkstoff Phosphinothricin (PPT) der Bakteriengattung *Streptomyces* wird seit 1984 künstlich hergestellt (MONSANTO 2003) und in der Landwirtschaft als Breitbandherbizid mit Handelsnamen wie BASTA® und Liberty® genutzt. PPT (= Glufosinat) ist ein schnell wirkendes Kontaktherbizid, das über grüne Pflanzenteile aufgenommen wird (HOECHST 2004).

Die erzielte Wirkung ist von der inkorporierten Dosis sowie der Lichtintensität abhängig. Aufgrund der geringen Translokation ist die systemische Wirkung unbedeutend. Nach RIDLEY und MC NALLY (1985) sind Dikotyledone deutlich empfindlicher gegen PPT als Monokotyledone, da ihre große Blattfläche eine höhere Aufnahme an PPT ermöglicht. In der Pflanze bewirkt PPT eine Akkumulation des Zellgiftes Ammoniak. Der aktive Wirkstoff D,L-Homocystein-4-(methyl)-Phosphinat ist das L-Enantiomer. Es hemmt kompetitiv die Glutaminsynthetase (GS), das Schlüsselenzym des Stickstoffwechsels zur Metabolisierung von Ammonium (RUHLAND et al. 2002). Als strukturelles Analogon des Substrates Glutamat bindet L-PPT an die GS und blockiert diese. Kann Ammonium nicht mehr metabolisiert werden, zerstört es Zellmembranen, inhibiert die Photosynthese und es entsteht ein Mangel an Aminosäuren. Betroffene Gewebe und letztlich die ganze Pflanze sterben ab.

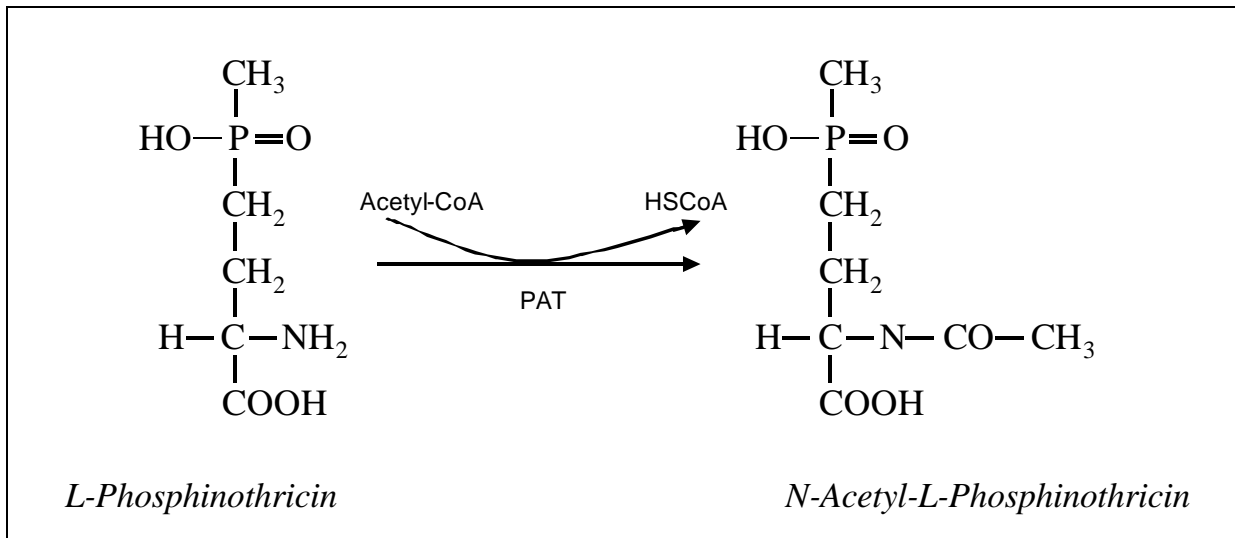


Abbildung 1-3: Enzymatische Inaktivierung von L-Phosphinothricin durch Acetylierung nach DRÖGE (1992)

Acetyl-CoA = Acetyl-Koenzym A, HSCoA = Koenzym A mit gebundenem Schwefel und Wasserstoff, PAT = Phosphinothricinacetyltransferase

Das Bodenbakterium *Streptomyces viridochromogenes* schützt sich gegen L-PPT mit seiner Phosphinothricinacetyltransferase (PAT). Das Enzym metabolisiert L-PPT via Acetylierung der Aminogruppe zu dem stabilen *N*-Acetyl-L-Phosphinothricin, das nicht an die GS binden und sie blockieren kann (Abbildung 1-3). Seit 1988 wurden Kulturpflanzen mit dem *pat*-Gen transformiert (WOHLLEBEN et al. 1988). Es verleiht ihnen die Fähigkeit PPT zu inaktivieren und macht sie tolerant gegen Glufosinatapplikationen. Glufosinat wird von Bodenorganismen schnell metabolisiert, so dass nach SMITH (1988) bei 20°C die Bodenhalfwertszeit bei nur ca. 10 Tagen liegt.

1.2.3 EPSPS-Toleranz

Die letale Wirkung des systemischen Wirkstoffs Glyphosat geht auf eine Hemmung der pflanzlichen 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSPS) zurück, einem essentiellen Enzym beim Aufbau aromatischer Metabolite (SHIRAI et al. 1998). Insbesondere aromatische Aminosäuren sind die Vorläufer vieler essentieller, sekundärer Inhaltsstoffe wie Lignin, Anthocyane, Phytohormone und Phenole. Bei einem Mangel an sekundären Inhaltsstoffen zeigt die Pflanze zunächst Wachstumsstörungen, Chlorosen, Nekrosen und stirbt letztlich ab. Aufgrund ihres anderen Aufbaus zeigte sich die EPSPS von *Agrobacterium sp.* Stamm C4 (CP4-EPSPS) auch in Gegenwart von Glyphosat effizient beim Umsatz von Phosphoenolpyruvat (PEP). Das *epsps*-Gen, das für die bakterielle EPSPS kodiert, wurde in transgene Kulturpflanzen integriert, wodurch sie gegenüber glyphosathaltigen Herbiziden wie Roundup Ready® (RR-Toleranz) tolerant wurden (SHIRAI et al. 1998).

1.3 Biotechnologische Nachweissysteme

Methoden, die eine verlässliche Kennzeichnung von GVO gewährleisten, basieren entweder auf dem Nachweis der transgenen DNA oder der exprimierten GVO-Produkte. Transgene Eigenschaften können mit Hilfe von Biotests oder chemischen Analysen wie der Chromatographie und der Nah-Infrarotspektroskopie effektiv detektiert werden (LONGSTAFF et al. 1995; ANKLAM et al. 2002). Zum Nachweis transgener Proteine sind Immunoassays zur Zeit die bedeutendsten Detektionssysteme und zum Nachweis der transgenen DNA PCR-basierende Methoden.

1.3.1 Biotest

Liefert die neue transgene Eigenschaft der GVP einen Selektionsvorteil gegenüber ihrer nicht transformierten Ausgangslinie, können Biotests zum Nachweis verwendet werden. Dies trifft insbesondere bei Antibiotika- und Herbizidtoleranz zu. Die Pflanzen werden in der Regel im Keimlingsstadium mit ausreichenden Mengen des antibiotika- oder herbizidhaltigen Wirkstoffs behandelt, so dass nur transgene Pflanzen überleben. VAN HOEF et al. (1998) sowie SHIRAI et al. (1998) beschrieben diese Methode im Vergleich zur PCR-Analyse für RR-Soja. Keimlinge von konventionellem und RR-Soja wurden mit einer 2,3%igen Wirkstofflösung besprüht (VAN HOEF et al. 1998). Die Methode ist kostengünstig, impliziert jedoch einen relativ großen Anteil von nicht GVP, die eine Herbizidspritzung überleben (SCHWARZ 2002).

1.3.2 Immunologische Analysen

Die meisten gentechnisch veränderten Organismen produzieren aufgrund ihres veränderten Genoms für den Organismus 'fremde' Proteine. Da diese GV-Produkte nach MITCHELL und BRADBURY (1999) in der öffentlichen Diskussion im Verdacht stehen, neue, unbekannte Allergien auszulösen, gehören Protein Assays zu den wichtigen GVO-Nachweissystemen. Antikörper sind Teil der komplexen Immunantwort höherer Lebewesen und lassen sich als empfindliche Reagenzien zur spezifischen Detektion von Makromolekülen wie Proteinen und Polysacchariden, aber auch kleinen Molekülen (Haptene) nach entsprechender Bindung an immunogene Substanzen einsetzen (BONFINI et al. 2001). Die Grundlage der Detektion ist die Fähigkeit der Antikörper, bestimmte Antigene auf Oberflächen zu erkennen und mit ihnen einen Komplex zu bilden. Der Nachweis und die Quantifizierung dieses Komplexes erfolgt meist über eine Fluoreszenzmarkierung des Antikörpers. Zu den Immunoassays gehören einfache Präzipitationstests, Agglutinationen von Zellen und anderen Partikeln, elektrophoreti-

sche Immunopräzipitation in Agar (Immunoblot), Kombinationen mit Western Blot-Analysen sowie Radio- und Enzymimmunoassays.

Nach BONFINI und Mitarbeitern (2001) ist der bedeutendste Immunoassay der Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA-Test), bei dem entweder Antikörper oder Antigene auf einer Festphase immobilisiert werden. Heutzutage werden ELISA-Tests hauptsächlich im Mikrotiter-Format durchgeführt. Um eine hohe Vergleichbarkeit zu erreichen, finden bevorzugt monoklonale Antikörper Verwendung (VAECK et al. 1987; VAN DUIJN et al. 1999), die eine identische Struktur und Reaktivität zeigen (BRETT et al. 1999). Aber auch polyklonale Antiseren werden eingesetzt (ROGAN et al. 1999; PAN 2002).

In der Regel haben ELISA-Tests einen niedrigen Hintergrund, sind spezifisch, sensitiv, robust, einfach zu bedienen und billig. Die Nachweisgrenze für GV-Proteine liegt bei ca. 0,25 - 1% Anteil (AHMED 2002; PAN 2002). Die Formate erlauben ein hohes Automatisierungsniveau und einen hohen Probendurchsatz. Aufwendig ist nach VAN DUIJN et al. (1999) jedoch die Isolation des verantwortlichen GV-Proteins bzw. seine künstliche Herstellung für die Immunisierung. Die Genauigkeit und Präzision immunologischer Tests kann bei geringer Affinität der Antikörper, durch starke Degradierung der Proteine aufgrund thermaler Behandlung oder durch hohe Matrixkomplexizität nachteilig beeinflusst werden (VAN DUIJN et al. 2002). In der Lebensmittelanalyse werden Immunoassays nach STAVE (1999) seit langem zum Nachweis von Allergenen, Hormonen, Pestiziden, Mikroorganismen, Antikörpern und zur Identifizierung der Spezies verwendet.

Zum GVP-Nachweis wurden bereits einige immunologische Screening-Tests für Baumwolle, Salat und Kartoffeln beschrieben (ROGAN et al. 1992; FUCHS et al. 1993; WOOD et al. 1995; MC KENZIE et al. 2000). Auch spezifische Immunoassays, die auf dem Nachweis der EPSPS- bzw. des CryIA(b)-Proteins beruhen, sind bereits für Mais und Soja beschrieben (VAECK et al. 1987; VAN DUIJN et al. 1999; LIN et al. 2001; STAVE 2002). KOK und Mitarbeiter (2002) bezeichnen es jedoch als Nachteil, dass mit ELISA-Tests zwei GVP-Varianten mit verschiedenen Genkonstrukten, die das gleiche Protein exprimieren nicht unterschieden werden können. Zudem können Probleme in der Bewertung immunologischer Tests entstehen, wenn die GV-Linien ein stark unterschiedliches Expressionsniveau zeigen. Auf dem Markt werden nach LIPP und ANKLAM (2000) schon einige Kits angeboten, die auf immunologischen Methoden bzw. ELISA-Tests beruhen. Vor allem in den USA sind die schnellen und von ungeschultem Personal leicht zu bedienenden Streifen-Tests beliebt, mit denen die Überschreitung gewisser Grenzwerte überprüft werden kann (STAVE 2002).

Neben den ELISA-Tests gibt es die Möglichkeit, Zielproteine mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat (SDS) -Gelen aufzutrennen und auf einer Nitrozellulosemembran (Western-Blotting) mit spezifischen Antikörpern qualitativ zu detektieren (PÖPPING 2001). Die Farbmarkierung erfolgt nach AHMED (2002) mit Ponceau, Silbernitrat, Coomassie oder unter Verwendung von Enzymsystemen wie Peroxidase und Phosphatase. Die Nachweisgrenze dieser Systeme schwankt zwischen 0,25 –1% (PAN 2002).

Generell können Proteinnachweissysteme nicht verwendet werden, wenn die 'fremden' Gene nicht bzw. nicht in allen Pflanzenteilen exprimiert werden, das Expressionsniveau extrem niedrig ist (LONGSTAFF et al. 1995) oder die Antisense-Technik verwendet wurde (HEMMER und PAULI 1998; BONFINI et al. 2001). BONFINI et al. (2001) heben hervor, dass die Proteine nicht so stark degradiert sein dürfen, dass ihre Tertiär- und Quartärstruktur zerstört ist. Daher ist nach EINSPANIER (2001) zum GVO-Nachweis die PCR- der ELISA-Technik vorzuziehen. Auch eine Kombination von PCR- und ELISA-Technik, die PCR-ELISA wurden bereits etabliert. Sie quantifizieren die PCR-Produkte durch sekundäre Bindung mit farbmarkierten Antikörpern in der flüssigen (LIU et al. 2003; PETIT et al. 2003) oder festen Phase (BRUNNERT et al. 2001).

1.3.3 Chromatographie

Wurde die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe eines GVO gravierend abgewandelt, kann nach BONFINI et al. (2001) eine chromatographische Methode zur Detektion des modifizierten chemischen Profils eingesetzt werden. Zur Detektion von gentechnisch verändertem *Brassica napus* wurde die HPLC-Methode (High Performance Liquid Chromatography) verbunden mit einer massenspektrometrischen Methode bereits erfolgreich eingesetzt. So konnte mit dieser Methode festgestellt werden, dass GVP-Rapsöl erhöhten Gehalt an Triacylglycerolen aufweist (ANKLAM et al. 2002). Von PAN (2000) wurde mit einer Methode gekoppelt, aus Gaschromatographie und Flammen-Ionisierungsdetektor, die Fettsäurezusammensetzung bestimmt. Die chromatographischen Analysen zählen nach BONFINI et al. (2001) zu den qualitativen Detektionsmethoden.

1.3.4 Nah-Infrarotspektroskopie

Einige genetische Veränderungen können die Faserstruktur der Pflanzen modifizieren ohne eine signifikante Abweichung der Proteinzusammensetzung zu verursachen. Solche Modifikationen wurden von BONFINI et al. (2001) durch Nah-Infrarotspektroskopie (NIR) detektiert. Diese Technik erkennt nicht die Veränderung von Einzelkomponenten wie der DNA oder von Proteinen, sondern von übergeordneten strukturellen Veränderungen. Die Kapazität der NIR-Technik zum Nachweis geringer GVO-Mengen in Chargen aus Nicht-GVO ist jedoch wie bei der Chromatographie gering (ANKLAM et al. 2002). Der Vorteil der NIR ist nach AHMED (2002), dass keine Probenaufbereitung nötig ist, womit in der Saatgutanalyse ganze Samen verwendet werden können. Damit ist NIR eine schnelle und billige Methode. Zur Kalibrierung muss jedoch das Spektrum jeder einzelnen transgenen Eigenschaft aufgenommen werden (PAN 2002).

1.3.5 DNA-Analysen

DNA-Analysen sind die direktesten Methoden zum Nachweis einer gentechnischen Veränderung. Aufgrund der chemischen und thermalen Stabilität von Nukleinsäuren sind DNA-basierende Detektionsmethoden anderen Methoden zum GVO-Nachweis überlegen. Ein weiterer, entscheidender Vorteil ist nach HEMMER und PAULI (1998) die Unabhängigkeit der DNA-Analyse von der Expression des 'Fremdgens' sowie der Gegenwart 'transgener' Proteine.

Konventionelle PCR

Das Prinzip der DNA-Replikation, die in jeder lebenden Zelle stattfindet, ist die Grundlage der PCR. Obwohl dieses Prinzip von KLEPPE et al. (1971) bereits im Jahr 1971 als DNA-Reperaturmechanismus beschrieben wurde, konnte es erst nach Einführung einer thermostabilen DNA-Polymerase im Jahr 1984 eine breite Anwendung finden (SAIKI et al. 1988).

Die PCR-Analyse erlaubt eine exponentielle Vermehrung von DNA-Fragmenten auf hochspezifische und empfindliche Weise, durch die Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden (Primern), die zu je einem Strang der Zielsequenz komplementär sind. Nach einer Hitze-Denaturierung der DNA-Doppelstränge lagern sich die Primer an die komplementäre DNA-Zielsequenz an, was als Primer-Annealing bezeichnet wird. Im folgenden Extensionsschritt werden die Primer von der DNA-Polymerase vom 3'-OH-Ende beginnend in 5'→3' Richtung zur Synthese eines neuen DNA-Strangs verlängert. Durch zyklische Wiederholung der Temperaturoptima der einzelnen PCR-Schritte wird die Zielsequenz zwischen den beiden

Primern exponentiell vermehrt. Zur visuellen Auswertung werden die angefärbten PCR-Produkte auf Gele aufgetragen, in denen sie durch Anlegung eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden. Nur PCR-Produkte unterschiedlicher Basenpaarlängen können mit Hilfe dieser Gelelektrophorese aufgrund ihrer differentiellen Laufgeschwindigkeit unterschieden werden. Bei PCR-Produkten gleicher Länge schließen sich Folgeanalysen an, wie ein Restriktionsverdau, ein zusätzlicher 'Nested PCR' Schritt, Southern-Blot-Analysen oder eine Sequenzierung (MEYER 1999).

Seit der Erfindung der PCR hat sich das Feld der DNA-Analysen in der Molekularbiologie stark verändert. Wegen ihrer Einfachheit, Spezifität und Empfindlichkeit gewann die PCR-Technik auch auf dem Gebiet der Qualitätssicherung von Lebensmitteln zunehmend an Bedeutung. Seither wird die PCR zur Bestimmung und zum Nachweis von Mikroorganismen (ALLMANN et al. 1995; BASSLER et al. 1995; CANDRIAN 1995; LEVIN 2003) ebenso eingesetzt, wie für den Nachweis von Lebensmittelzutaten in Fleisch (MEYER et al. 1995, 1996; SAWYER et al. 2002; GAO et al. 2003), Fisch (QUINTEIRO et al. 1998; CÉPEDES et al. 1999) und in pflanzlichen Verarbeitungsprodukten (ALLMANN et al. 1995; WOLF et al. 2001; ARLORIO et al. 2003; SANDBERG et al. 2003). Selbst stark verarbeitete Lebensmittel wie Brot, Biskuits, Chips, Ketchup, Püree, Polenta, Suppen und Tofu können einer PCR-Analyse unterzogen werden (HEMMER und PAULI 1998; STRAUB et al. 1999; LIPP et al. 2001). Durch ihre hohe Spezifität und Sensitivität fand die PCR-Methode, unabhängig von der Vielzahl möglicher DNA-Analysen, bislang die breiteste Akzeptanz und Anwendung in der GVO-Analytik (MEYER 1999; ANKLAM et al. 2002). Der einzige Nachteil der PCR-Methode war noch in den 90iger Jahren, dass sie im Vergleich zur ELISA-Technik keine verlässliche Quantifizierung ermöglichte (ALLMANN et al. 1995).

Quantitative Endpunkt-PCR

Die erste semi-quantitative Endpunkt-PCR war eine kompetitive PCR (GILLILAND et al. 1990; RIEDY und STEWART 1995). Ihr Prinzip ist die Amplifikation einer Zielsequenz in Anwesenheit einer Kompetitorsequenz mit denselben Primern in derselben PCR-Reaktion (WURZ et al. 1999; HÜBNER et al. 2001). Beide konkurrieren unter diesen Bedingungen um die Reagenzien. Werden von der Zielsequenz Verdünnungsstufen hergestellt, die alle mit derselben Konzentration an Kompetitor-DNA koamplifiziert werden, kann eine vergleichende Quantifizierung über Agarosegele erfolgen. Jene Verdünnungsstufe, deren Bande die gleiche Intensität zeigt wie die der Kompetitorsequenz, hat auch die gleiche DNA-Menge wie diese. Dabei erfolgt die Analyse unbekannter Proben über die Ableitung einer Regression (PAN 2002). Für

eine Zielsequenz muss dazu eine Kompetitorsequenz entworfen werden, die dieser möglichst ähnlich und gleichzeitig von ihr unterscheidbar ist. Der Kompetitor kann nach HÜBNER et al. (2001) eine geklonte Zielsequenz auf einem linearisierten Plasmid sein, die eine DNA-Deletion oder DNA-Insertion aufweist.

Die kompetitive PCR ist zwar empfindlich, durch die Konkurrenz zwischen interner Zielsequenz und Standard kommt es jedoch im Vergleich zu Monoplexreaktionen generell zu Sensitivitätsverlusten (PAN 2002). Zudem beinhaltet der Quantifizierungsschritt über Gelelektrophorese das Risiko von Kreuzkontaminationen. Ein weiterer Nachteil ergibt sich in der GVO-Analytik der Lebensmittelindustrie. Die DNA-Fragmente in stark verarbeiteten Lebensmittelproben sind meist nur ca. klein 100-400 Basenpaare (bp) klein (MEYER 1999; STRAUB et al. 1999; ANKLAM et al. 2002), so dass eine Auftrennung von Ziel- und Kompetitorsequenz auf dem Gel erschwert wird. Mit bevorzugten Amplikonlängen von 70-200 bp hat die Real-Time PCR auf diesem Gebiet ideale Voraussetzungen (BERDAL und HOLST-JENSEN 2001).

Real Time PCR

Die Real-Time PCR ist keine Endpunktanalyse. Sie erlaubte zum ersten Mal eine Dokumentation des PCR-Verlaufes über die gesamte Amplifikation. Die verschiedenen Real-Time PCR Systeme unterscheiden sich von der konventionellen PCR dadurch, dass die Menge an entstehendem Amplikon indirekt über ein Fluoreszenzsignal gemessen wird. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zur entstehenden Amplikon-Menge und wird während des gesamten PCR-Verlaufs im Reaktionsgefäß detektiert, weshalb von Real-Time PCR gesprochen wird (Echtzeit-Aufzeichnung). Das während der PCR entstehende Amplikon kann entweder direkt oder indirekt über die verwendeten Primer bzw. sogenannte Sonden markiert werden. Nach einer Lichtanregung emittieren diese Farbstoffe Licht einer spezifischen Wellenlänge.

Der SYBR[®] Green I Assay ist ein spezifischer Assay zum direkten Nachweis von doppelsträngiger DNA (dsDNA). Der Farbstoff interkaliert in das entstehende dsDNA-Amplikon zweier konventioneller PCR-Primer (MORRISON et al. 1998; HOWELL et al. 1999; GIGLIO et al. 2003). Die Spezifität des Systems ist gering, da Primerdimere und Nichtziel-Amplikons ebenfalls detektiert werden (WITTEWITZ et al. 1997; TERRY et al. 2002).

Alle Assays, bei denen Oligonukleotide Fluoreszenzfarbstoffe tragen, sind Sequenz spezifisch. Meistens nutzen sie den Fluoreszenz-Energietransfer (FRET), bei dem ein Energietransfer von einem Donor- zu einem Akzeptorfluorophor stattfindet. Dabei dürfen nach NAZARENKO et al. (1997) die Farbstoffe nicht weiter als 70-100 Å voneinander entfernt sein. Das Prinzip, das den Real-Time PCR Assays mit 'Scorpions' (WHITCOMBE et al. 1999; THELWELL

et al. 2000; BATES und TAYLOR 2001), 'Molecular Beacon' Sonden (PIATEK et al. 1998; BONNET et al. 1999; TYAGI et al. 2000) und 5'→3'-Exonuklease-Sonden (BASSLER et al. 1995; LIVAK et al. 1995) zugrunde liegt, ist die Verwendung eines fluorogenen Reporters und eines Quenchers. Beide sind jeweils an einem der beiden Enden einer Sequenz spezifischen Oligonukleotid-Sonde kovalent gebunden (LEE et al. 1993). Bei einer nicht hybridisierten Sonde wird die Fluoreszenz des Reporters durch die räumliche Nähe zum Quencher unterbunden. Nach der Hybridisierung der Sonde an ihre Zielsequenz wird diese Nähe aufgehoben und die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs kann detektiert werden.

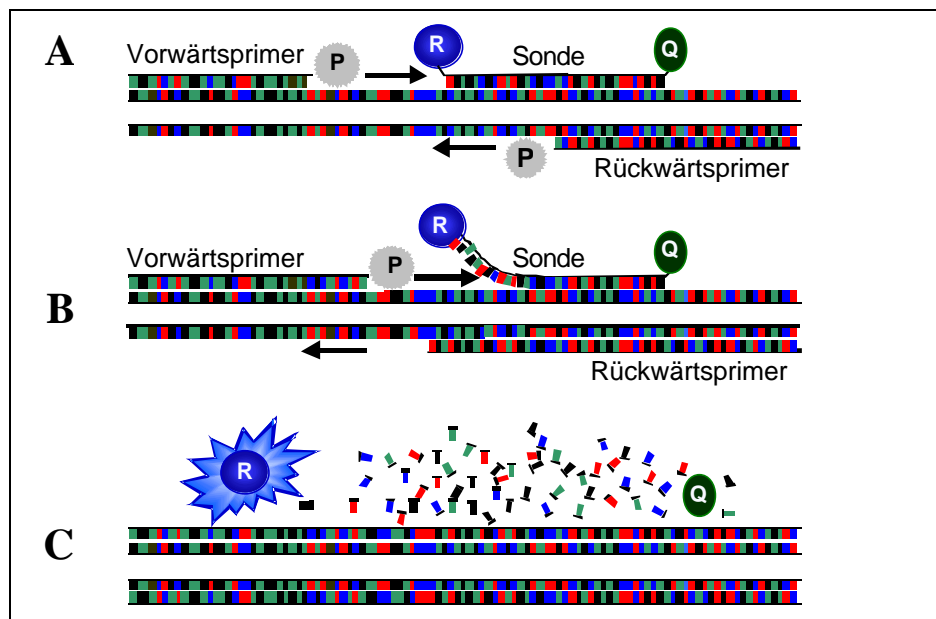


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Funktionsweise von 5'→3'-Exonuklease-Sonden

- A: Während des PCR-Extensionsschrittes werden die Primer von der DNA-Polymerase verlängert
 - B: Die DNA-Polymerase trifft auf die Sonde und beginnt diese mit Hilfe ihrer 5'→3'-Exonukleaseaktivität abzubauen
 - C: Die Sonde ist enzymatisch abgebaut, so dass Reporter- und Quencherfarbstoff räumlich distanziert sind und der Reporterfarbstoff detektierbar wird
- R= Reporter, Q= Quencher, P= DNA-Polymerase

In Abbildung 1-4 ist die Signaldetektion von 5'→3'-Exonuklease-Sonden schematisch dargestellt. Bei den haarnadelförmigen 'Scorpions' und 'Molecular Beacons' werden Reporter und Quencher bei der Bindung an ihre Zielsequenz durch eine Konformationsänderung separiert (HU et al. 1999; ROBINSON und MUELLER 2000). Die Haarnadelstruktur wird durch Einführung eines doppelsträngigen Bereichs erzeugt, der Reporter und Quencher nah zusammenhält. Die Sequenz der 'Nadelöse' ist zur DNA-Matrize komplementär. Der Unterschied ist nach TERRY et al. (2002) im Wesentlichen, dass 'Molecular Beacons' zusätzlich zu den Primern eine Oligonukleotidsonde einführen, die Reporter und Quencher an ihren 5'- bzw. 3'-Ende

trägt, während beim 'Scorpion' Assay ein Primer diese Funktion übernimmt. Bindet eine 'Molecular Beacon' Sonde intermolekular an ihre Zielsequenz, so wird die Haarnadelstruktur geöffnet, wodurch Quencher und Reporter separiert werden. Der 'Scorpion' ist dagegen am 5'-Ende der 'Haarnadel' im Anschluss an einen PCR-Blocker zusätzlich mit einem einzelsträngigen Primerbereich versehen. Während der Extensionsphase der PCR wird dieser Bereich verlängert, wodurch zunächst ein Amplikon mit 'Haarnadel'-Anhängsel entsteht. Beim Denaturierungsschritt öffnet sich die 'Haarnadel' und im anschließenden PCR-Zyklus bindet der Bereich der 'Nadelöse' intramolekular an die zuvor entstandene, komplementäre Sequenz des Amplikons. Weitere Real-Time PCR Assays, die sich eine Haarnadelstruktur zu Nutze machen, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt (NAZARENKO et al. 1997 FAN et al. 2003). Diese Methoden sind jedoch bislang wenig bedeutend.

Die 5'-Exonuklease-Sonde ist komplementär zu einem Bereich zwischen den Primern. An ihrem 5'-Ende ist ein fluoreszierender Reporter und an ihrem 3'-Ende einen Quencher kovalent gebunden. Während der Primerverlängerung in der Extensionsphase der PCR trifft nach HOLLAND et al. (1991) die DNA-Polymerase auf die gebundene Sonde und baut sie aufgrund ihrer 5'→3'-Exonukleaseaktivität enzymatisch ab. Es kommt zur Separierung von Reporter und Quencher, zur Aufhebung des FRET und damit zur Detektion des Reporter-Signals. Dabei kann die 5'→3'-Exonuklease-Sonde selbst nicht als Startpunkt der DNA-Polymerase fungieren, da sie am 3'-Ende mit einem Phosphatrest blockiert ist (WITWERT et al. 1997; THELWELL et al. 2000).

Bei den LightCyclerTM-Sonden ist der Akzeptor nicht wie bei dem 5'-Exonuklease-Assay ein Quencher, sondern ein Fluorophor mit anderem Emissionsspektrum, das durch FRET vom Donor zur Lichtemission angeregt wird. Die Farbstoffe sind jeweils auf einer Donor- und Akzeptor-Sonde lokalisiert. Hybridisieren sie an die Zielsequenz, grenzen sie direkt aneinander. So kommt es nach CAPLIN et al. (1999) zum FRET und damit zur Detektion einer Akzeptor spezifischen Fluoreszenz.

Die Real-Time PCR erlaubt einen hohen Probendurchsatz sowie ein hohes Automatisierungsniveau. Dadurch, dass die Reaktionsgefäße zur Analyse nicht geöffnet werden, wird zusätzlich das Risiko der Kreuzkontaminationen stark eingeschränkt.

Prinzip der TaqMan[®] PCR

Der TaqMan[®] Assay ist ein 5'→3'-Exonuklease-Assay, der strikt Sequenz spezifisch für das verwendete Primer/Sonde-System ist (vgl. Abbildung 1-4). Das Fluoreszenzsignal ist nach WISEMAN (2002) proportional zur Synthese des PCR-Produktes. Mit Zunahme der PCR-Zyklen erhebt es sich über die Hintergrundfluoreszenz, geht in den linearen Bereich der exponentiellen Wachstumskurve (log linear region) über und erreicht ein Plateau.

Die Vermehrung der Zielsequenz erreicht den linearen Bereich der exponentiellen Phase dabei umso eher, je höher die Ausgangskopienzahl war. Als Bezugspunkt für die Menge der Ausgangskopienzahl dient die Anzahl an PCR-Zyklen bis zum Erreichen der linearen Phase. Dazu wird ein Fluoreszenzwert als Basis (Baseline) festgelegt, bei dem sich alle Reportersignale in der linearen Phase befinden. Der PCR-Zyklus, bei dem die Reportersignale diese Baseline (threshold cycle, Ct-Werte) schneiden (WISEMAN 2002), dient als Vergleichsgröße der Proben und ist spezifisch für ihren DNA-Gehalt.

Um von den Ct-Werten zur Quantifizierung der Sequenzen zu gelangen, stehen je nach Fragestellung verschiedene Strategien zur Auswahl. Für die Schätzung unbekannter Proben werden allgemein Standards mit bekanntem DNA-Gehalt mitgeführt. Von den logarithmierten DNA-Konzentrationen der Standards wird eine lineare Regression abgeleitet und die DNA-Konzentration unbekannter Proben durch Intrapolation geschätzt.

Für Multiplexreaktionen stehen Reporter-Farbstoffe verschiedener Emissionsspektren zur Verfügung, die alle mit Licht von 488 nm angeregt werden. Hierfür sollten die Emissionsspektren der gewählten Farbstoffe möglichst weit auseinander liegen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Die folgende Auflistung enthält die Hersteller und Spezifikationen der benutzten Chemikalien bzw. Agenzien. Eine Beschreibung der Verbrauchsmaterialien erfolgt unter den entsprechenden methodischen Absätzen bzw. in Kapitel 2.1.2 Basislösungen.

Tabelle 2-1: Chemikalien und Agenzien

Chemikalien/ Agenzien	Spezifikation	Hersteller
[α - ³² P]dCTP	3000Ci/mmol	Amersham Pharmacia Biotech, S-Uppsala
Agarose	Ultra Qualität	Roth, D-Karlsruhe
Ampicillin	research grade	Serva, D-Heidelberg
Ammoniumpersulfat		Amresco, USA-Ohio
Bacto-Agar		Difco, USA-Detroit
Blockierungsreagenz		Roche, D-Mannheim
Borsäure	p.a.	Amresco, USA-Ohio
Bromphenolblau		Riedel-de Haën, D-Seelze
BSA (bovine serum albumine)	98%	Roth, D-Karlsruhe
Buffer EB, Tris-Cl 10 mM	pH 8.5	Qiagen, D-Hilden
Chloroform	p.a.	J.T. Baker, USA-Deventer
CTAB	p.a.	Fluka, CH-Buchs
dATP		Roche, D-Mannheim
dCTP		Roche, D-Mannheim
Dextran-Blau		Fluka, CH-Buchs
dGTP		Roche, D-Mannheim
dNTP		Qiagen, D-Hilden
DTT	p.a.	Roth, D-Karlsruhe
dTTP		Roche, D-Mannheim
EDTA	p.a.	Fluka, CH-Buchs
Eisessig, 100%		J.T. Baker, USA-Deventer
EtBr-Lösung, 1%ig	reinst	Roth, D-Karlsruhe
Ethanol absolute (EtOH)	p.a.	J.T. Baker, USA-Deventer
Formamid		Amresco, USA-Ohio
GeneScan-500 ROX		Applied Biosystems, USA-Foster City
Glucose		VWR-International, D-Darmstadt
Glycerin	99,5%	Roth, D-Karlsruhe
Harnstoff		Amresco, USA-Ohio
HCl	p.a.	J.T. Baker, USA-Deventer
Hefe-Extrakt		Difco, USA-Detroit
Hexanukleotide		Roche, D-Mannheim
Isoamylalkohol	p.a.	J.T. Baker, USA-Deventer
Isopropanol	p.a.	J.T. Baker, USA-Deventer
KCl	p.a.	J.T. Baker, USA-Deventer

Tabelle 2-1 (Fortsetzung): Chemikalien und Agenzien

Chemikalien/ Agenzien	Spezifikation	Hersteller
Long Ranger, Gellösung	50% Acrylamid-Lsg.	FMC, USA-Rockland
β-Mercaptoethanol	14,3 M	Roth, D-Karlsruhe
Maleinsäure		Sigma, USA-St. Louis
MetaPhor, Agarose	high resolution	FMC, USA-Rockland
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	p.a.	J.T. Baker, USA-Deventer
MgSO ₄ · 6 H ₂ O	p.a.	Sigma, USA-St. Louis
NaAc-Trihydrat	p.a., kristallin	Roth, D-Karlsruhe
NaCl	p.a.	J.T. Baker, USA-Deventer
NaOH	p.a.	VWR-International, D-Darmstadt
Natriumcitrat	p.a.	Sigma, USA-St. Louis
Natriumlauroylsarcosin		Sigma, USA-St. Louis
PEG MW 8000		Sigma, USA-St. Louis
PicoGreen® dsDNA		Molecular Probes, USA-Eugene
SDS	2x kristallin	Serva, D-Heidelberg
Sephadex-G50	fine	Amersham Pharmacia Biotech, S-Uppsala
TEMED		Amresco, USA-Ohio
Tetracyclin		USB, USA-Cleveland
Tris	kristallin	Riedel-de Haën, D-Seelze
Trypton		Difco, USA-Detroit
Wasser	reinst	Eppendorf, D-Hamburg

2.1.2 Basislösungen

Ampicillin (50 mg/ml)

Ampicillin wurde in entsprechender Menge in bidestilliertem Wasser gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert

1,0x CTAB

Die Menge für 1% (w/v) CTAB sowie 0,7 M NaCl wurde eingewogen, in 50 mM Tris•Cl (pH 8,0) und 10 mM EDTA (pH 8,0) gelöst, autoklaviert und bei Raumtemperatur (RT) gelagert

Chloroform/Isoamylalkohol

Chloroform und Isoamylalkohol wurden im Verhältnis 24:1 gemischt und bei RT gelagert

1 M DTT

Die entsprechende Menge DTT wurde in 10 mM NaAc (pH 5,2) gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert

0,5 M EDTA (pH 8,0)

Die entsprechende Menge EDTA wurde in bidestilliertem Wasser gelöst, mit NaOH auf pH-Wert 8,0 eingestellt, auf das Endvolumen aufgefüllt, autoklaviert und bei +4°C gelagert

EtBr-Lösung (10 mg/ml)

Die entsprechende Menge EtBr wurde eingewogen, mit bisterilem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt, mehrere Stunden gerührt und im Dunkeln bei +4°C gelagert

Maleinsäurepuffer (100 mM)

Die entsprechende Menge Maleinsäure wurde eingewogen, mit NaCl (150 mM) und konzentrierter NaOH auf pH 7,5 eingestellt und bei -20°C gelagert

1 M MgCl₂

Die entsprechende Menge MgCl₂ · 6 H₂O wurde in bidestilliertem Wasser gelöst, die Lösung autoklaviert und bei RT gelagert.

0,1 M MgSO₄

Die entsprechende Menge MgSO₄ · 6 H₂O wurde in bidestilliertem Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei RT gelagert

3 M NaAc (pH 5,2)

Die entsprechende Menge NaAc wurde in bidestilliertem Wasser gelöst, mit Eisessig auf pH-Wert 5,2 eingestellt, autoklaviert und bei RT gelagert

5 M NaCl

Die entsprechende Menge NaCl wurde in bidestilliertem Wasser gelöst, autoklaviert und bei RT gelagert

10 N NaOH

Die entsprechende Menge NaOH wurde in bidestilliertem Wasser unter Kühlung aufgelöst und bei RT gelagert

28% PEG 8000 (w/v)

Die entsprechende Menge PEG wurde unter Rühren in 5 M NaCl gelöst und bei RT gelagert

3,0 x SDS

Die Menge für 3% (w/v) SDS wurde in 700 mM NaAc (pH 5,2) und 20 mM EDTA (pH: 8,0) gelöst, mit konzentrierter NaOH auf pH 5,5 eingestellt, autoklaviert und bei RT gelagert

10 x TBE-Puffer

Die entsprechende Menge TBE für 0,89 M Borsäure und 0,89 M Tris·Cl wurden eingewogen, in 20 mM EDTA (pH 8,3) gelöst und bei RT gelagert

Tetracyclin (10 mg/ml)

Die entsprechende Menge Tetracyclin wurde in 70% (v/v) EtOH gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert

1 M Tris·Ac

Die entsprechende Menge Tris wurde in bidestilliertem Wasser aufgelöst, mit konzentrierter Essigsäure auf pH-Wert 8,0 eingestellt, das Volumen aufgefüllt und autoklaviert

1 M Tris·Cl

Die entsprechende Menge Tris wurde in bidestilliertem Wasser aufgelöst, mit konzentrierter HCl auf pH-Wert 8,0 eingestellt, das Volumen aufgefüllt und autoklaviert

2.1.3 DNA-Molekulargewichts- und -Längenstandards

Tabelle 2-2: DNA-Molekulargewichts- und -Längenstandards

Standard	Hersteller
pUC19 DNA / <i>Msp</i> I	MBI Fermentas, D-St.Leon-Rot
100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, D-St.Leon-Rot
λ DNA <i>Hind</i> III	MBI Fermentas, D-St.Leon-Rot
1kb DNA Ladder	MBI Fermentas, D-St.Leon-Rot

2.1.4 Enzyme

Tabelle 2-3: Enzyme

Enzym	Anwendung	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Dephosphorylierung	Amersham Pharmacia Biotech, S-Uppsala
AmpliTaq Gold	hot start polymerase	Applied Biosystems, USA-Foster City
<i>Bam</i> HI	RFLP	MBI Fermentas, D-St.Leon-Rot
<i>Eco</i> RI	RFLP	MBI Fermentas, D-St.Leon-Rot
<i>Eco</i> RV	RFLP	MBI Fermentas, D-St.Leon-Rot
<i>Hind</i> III	RFLP	MBI Fermentas, D-St.Leon-Rot
Klenow-Enzym	RFLP	Roche, D-Mannheim
<i>Not</i> I	Plasmidlinearisierung	MBI Fermentas, D-St.Leon-Rot
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	proof reading polymerase	Stratagene, NL-Amsterdam
<i>Pme</i> I (MssI)	Plasmidlinearisierung	MBI Fermentas, D-St.Leon-Rot
Polynukleotidkinase	Ligation	Hybaid GmbH, D-Heidelberg
Proteinase [®] K	genom. DNA-Isolation	Qiagen, D-Hilden
RNase A	genom. DNA-Isolation	Qiagen, D-Hilden
<i>Sca</i> I	Plasmidlinearisierung	MBI Fermentas, D-St.Leon-Rot
T4 DNA Ligase	Ligation	USB Corporation, USA-Cleveland
T4 PNK	Ligation	USB Corporation, USA-Cleveland
Taq DNA Polymerase	PCR	Qiagen, D-Hilden
Thermo Sequenase [™] II	Sequenzierung	Amersham Pharmacia Biotech, S-Uppsala
<i>Xba</i> I	Plasmidlinearisierung	MBI Fermentas, D-St.Leon-Rot

2.1.5 Oligonukleotide

Tabelle 2-4: Oligonukleotide

	Name	Sequenz (5'-3')	Amplikon	Zielsequenz	EMBL
Sequenzierung					
pCR [®] 4-TOPO [®]	M13 Forward M13 Reverse	GTAAAACGACGGCCAG CAGGAAACAGCTATGAC	166 bp		
Qualitative PCR Assays zum Transgennachweis					
Referenzsystem Raps	PE-for PE-rev	GTTCTGTTTTGTAGAGTTTTGGAA GACAAGAGACAAGAGTGGCTATTAT	411 bp	Phosphoenolpyruvat Carboxylase	D13987
Referenzsystem Raps	s_gt-f s_gt-r	CAAAGACGATAAAGGCTACGGC TAATGCTCCGATCAGAGCTTCC	614 bp	S-glucosyl- transferase	A62529
Referenzsystem Mais	ivr-f ivr-r	CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACC GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC	226 bp	Invertase	AF171874
Referenzsystem Zuckerrübe	bmv1-for bmv1-rev	CAGATGATTCACGAAGCAGG CCTAAGGACAACATAAGTTCTG	151 bp	Mikrosatellit	(MÖRCHEN et al. 1996)
P-35S-Screening	35S-1 35S-2	GCTCCTACAAATGCCATCA GATAGTGGGATTGTGCGTCA	195 bp	35S-Promotor des CaMV	A18053
<i>pat</i> -Gen	pat-f pat-r	TCTGGGTAAGTGGCCTAAGTGG TGCTGTAGCTGGCCTAATCTCA	439 bp	Phosphinothricin - acetyltransferase	A99126
Quantitative PCR Assays zum Transgennachweis					
Referenzsystem Raps	pepc3-TM-f pepc3-TM-r pepc3-TM-p	CTAGCGGCGTTTCAGACATTC GTCTGTCTCCGCAGTCGCA VIC -CGCTAGTGTAGACCAGTTCTTGAGCCGC - TAMRA	108 bp	Phosphoenolpyruvat Carboxylase	D13987
Referenzsystem Raps	s_gt-TM-f s_gt-TM-r s_gt-TM-p	GTCCAGTTCGCTAAACGCCTAGT GAGGCGGTGTAGGTGGTGG VIC -CCAAAGGCGTCAAAGTACAATCGC - TAMRA	71 bp	S-glucosyl- transferase	A62529
P-35S/ <i>pat</i> -Konstrukt	pat-TM-f pat-TM-r pat-TM-p	TAGCTGGCCTAATCTCAACTGGTC ATTTCAATTTGGAGAGGACAGGGTAC FAM -CCTCTCCGAGACATGTCGACTCTAGAGGAT - TAMRA	87 bp	35S-Promotor/ Phosphinothricin- acetyltransferase	A18053 A99126
P-35S-MGB-Screening	TM-35S-fm TM-35S-rm TM-35S-pm	CGTTCCAACCACGTCTTCAA ATTGTGCGTCATCCCTTACGTC FAM -AAGTGGATTGATGTGATATC - TAMRA	71 bp	35S-Promotor des CaMV	A18053

2.1.6 Pflanzenmaterial

Für die Entwicklung und Evaluierung der *pat*-Gen spezifischen Nachweissysteme wurden verschiedene Pflanzenarten untersucht, die alle mit dem Vektor pHoe6/Ac transformiert waren. Dieser enthält die kodierende Sequenz eines synthetischen *pat*-Gens unter der Kontrolle des 35S-Promotors aus dem Cauliflower Mosaic Virus (CaMV). Die Nukleotidsequenz des *pat*-Gens, wurde entsprechend der Kodonerkennung der Pflanzenarten modifiziert, ohne dabei die Aminosäuresequenz des Proteins zu verändern. Zwischen der rechten und linken Borderregionen enthält es einen Sequenzteil des Ti-Plasmids pTiT37 sowie pTiAch5.

Brassicaceae

Tabelle 2-5: *Brassica*-Species

Gattung / Art	dt. Bezeichnung	Sorte	Züchter
<i>Brassica oleracea acephala medullosa</i> Thell	Markstammkohl	'Marrow Stemm'	T. Church (Bures LTD) GB-C085JQ Bures Sussolk
<i>Brassica oleracea acephala gongyloides</i> L.	Kohlrabi	'Delikateß blau'	Quedlinburger Saatgut GmbH, D-06472 Quedlinburg
<i>Brassica oleracea oleracea gemmifera</i> (DC)	Rosenkohl	'Hilds Ideal'	Hild Samen GmbH, D-71672 Marbach
<i>Brassica rapa</i>	Winterrübsen	'Buko'	KWS Saat AG, D-37555 Einbeck
<i>Brassica rapa</i>	Winterrübsen	'Perko'	KWS Saat AG, D-37555 Einbeck
<i>Brassica rapa</i>	Sommerrübsen	'Nokonova'	KWS Saat AG, D-37555 Einbeck
<i>Brassica rapa rapifera</i>	Herbstrüben	'Rondo'	Joordens' Zaadhandel W.V., ND-5995 ZG Kessel LB
<i>Brassica rapa pekinensis</i> (Lour)	Chinakohl	'Canntoner Witkrop'	
<i>Raphanus sativus oleiferus</i>	Ölrettich	unbekannt	
<i>Sinapsis alba</i>	Gelbsenf	unbekannt	

Raps (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*)

Nichttransgene Ausgangssorten/ Linien:

- Linie Falcon (NPZ, D-Holtsee)
- MSL-Hybridsorte 'Artus' (NPZ, D-Holtsee)
- Hybridsorte Hyola 401 (Advanta Seeds, CAN-Winnipeg)

Transgene Sorten/Linien:

- 'Falcon GS40/90' ('Modul', Bayer CropScience AG, D-Monheim) hat den Vektor pHoe6/Ac (ausschließlich innerhalb der Border-Region) an zwei unabhängigen Loci stabil integriert. Es wurden keine Antibiotika-Resistenzgene integriert. Durch mehrmaliges Selbsten der Originaltransformante wurde eine Linie erzeugt.

- 'Avalon' (LL-Artus, Bayer CropScience AG, D-Monheim am Rhein) ist eine Hybridsorte der männlich sterilen Linie MSL 06 C, die auf die transgene Sorte 'Falcon GS40/90' zurück geht, mit der Sorte Chr. 1261/92 (HARMS 2003). Wie 'Falcon GS40/90' hat 'Avalon' den Vektor pHoe6/Ac an zwei unabhängigen Loci stabil integriert.

Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L. var. *altissima*)

Nichtransgene Ausgangssorten/ Linien:

- Ribella (SES Europe, B-Tiemen)

Transgene Sorten/ Linien:

- Prestige-LL, Transformationsereignis T120-7 (Bayer CropScience AG, D-Monheim am Rhein) hat den Teil des Vektors pOCA18/AC, der zwischen den beiden Border-Regionen liegt, stabil ins Genom integriert. T120-7 enthält eine Kopie des synthetischen *pat*-Gens unter der Kontrolle des 35S-Promotors und -Terminators. Zusätzlich wurde das Neomycin-Phosphotransferase-Gen (*npt II*-Gen) aus *Escherichia coli* unter der Kontrolle des Promotors der Nopalinsynthese und des Terminators der Octopinsynthese aus *Agrobacterium tumefaciens* stabil ins Genom integriert.

Mais (*Zea mais* L.)

Nichtransgene Ausgangssorten/ -linien:

- Monopol (KWS Saat AG, D-Einbeck)

Transgene Sorten/ Linien:

- Maislinie HE/89, Transformationsereignis T25 (Bayer CropScience AG, D-Monheim am Rhein) besitzt eine funktionale Kopie der kodierenden Sequenz des synthetischen *pat*-Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors und -Terminators, integriert in ein Chromosom des Maisgenoms. Wie der Vektor pHoe6/Ac enthält das hier verwendete modifizierte pUC18-Plasmid die kodierende Sequenz eines *pat*-Gens, dessen Nucleotidsequenz modifiziert wurde, um von Pflanzen bevorzugte Kodons zu erstellen. Außerdem besitzt T25 ein nicht funktionales Fragment des Ampicillin-Resistenz (*ampR*)-Genes und den ColE1-Replikationsursprung des pUC-Plasmids.
- Maislinie Maximizer[®], Transformationsereignis Bt176 (Novartis Seeds Inc., Greensboro, NC) besitzt pro haploidem Genom zwei funktionale Kopien eines synthetischen *cryIA(b)*-Gens mit Ursprung aus *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* HD-1 und eine Kopie des *bar*-Gens, abgeleitet aus der Sequenz von *Streptomyces viridochromogenes*. Das *cryIA(b)*-Gen verleiht eine Toleranz gegen den Maiszünzler und das *bar*-Gen gegen

gluphosinathaltige Herbizide. Von den zwei Expressionskassetten des *cryIA(b)*-Gens ist eine unter der Kontrolle des Calcium abhängige Proteinkinase-Promotors (CDPK-Promotor) und eine unter der Kontrolle des Phosphoenolpyruvat Carboxylase-Promotor (PEPC-Promotor), beide Promotoren sind aus Mais. Die Genkonstrukte sind unter der Kontrolle je eines CaMV-Terminators. Zusätzlich existiert im Genkonstrukt eine Kopie des *bar*-Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors und -Terminators (MATSUOKA et al. 2002).

- Maislinie YieldGard[®], Transformationsereignis MON810 (Monsanto Co. USA-St. Louis) besitzt eine Expressionskassette pro haploides Genom. Die Kassette hat eine Kopie des synthetischen *CryIA(b)*-Gens abgeleitet von *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 unter der Kontrolle eines 35S-Promotors mit verdoppeltem Enhancer und Intron 1 des *hsp70* (Hitzeschockproteins aus Mais, MATSUOKA et al. 2002).

2.2 Methoden

2.2.1 Feldprobennahme

Im Jahre 2000 kam es zu einem nicht genehmigten Anbau von GVP in Deutschland. Importiertes Sommerraps-Saatgut der Hybridsorte 'Hyola' (Advanta Seeds, CAN-Winnipeg), das einen unbekanntem Anteil herbizidtoleranter Samen enthielt, gelangte versehentlich in den deutschen Handel und wurde auf bayerischen Landwirtschaftsflächen angebaut. Es waren zwei Herbizidtoleranzen im Saatgut vorhanden. Eine Toleranz beruhte auf dem Gen für die 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSPS) gegen glyphosathaltige Herbizide wie Roundup Ready[®] (RR). Die andere Toleranz gegen Phosphinothricin (PPT) haltige Herbizide wie Liberty[®], beruhte auf dem Gen für die transgene Phosphinothricinacetyltransferase (*pat*). Fünf dieser Flächen wurden ausgewählt, um die Persistenz des transgenen Rapses vom Jahr 2000 bis zum Herbst 2002 zu dokumentieren (siehe Abbildung 2-1). Dazu erfolgte eine Aufnahme landwirtschaftlich relevanter Parameter dieser Flächen (vgl. Tabelle 3-7).

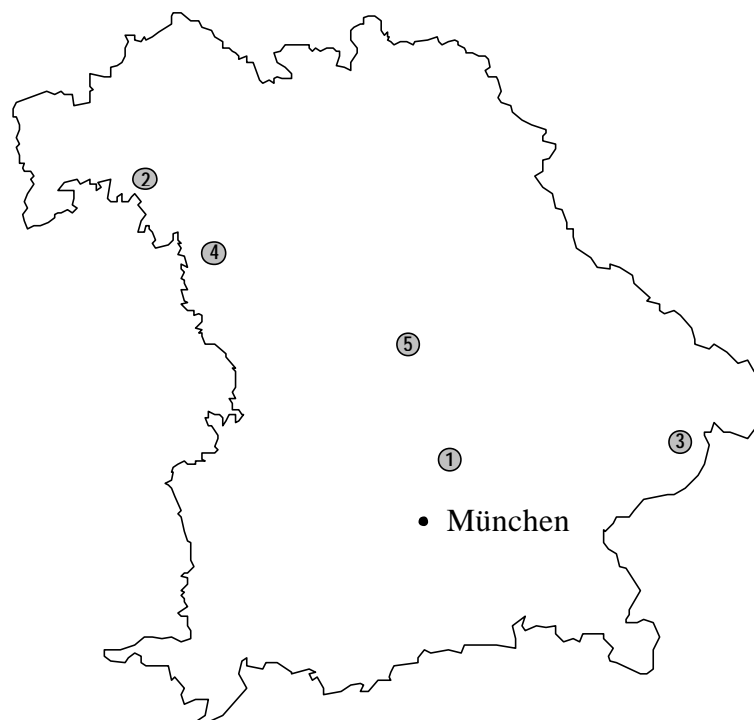


Abbildung 2-1: Regionale Verteilung der fünf 'transgen kontaminierten' Agrarflächen in Bayern

Die Beprobung der Agrarflächen erfolgte grundsätzlich so, dass evtl. vorhandene Ansammlungen transgener Pflanzen ('transgene Nester') aufgedeckt werden konnten. Dazu wurden Unterproben von bestimmten Flächenabschnitten gezogen. Durch die Bildung des Mittelwertes der Unterproben sollte anschließend eine Berechnung des durchschnittlichen Transgenan-

teils der Gesamtfläche erfolgen. In Anlehnung an die Empfehlungen des LAG (2001) wurden pro Fläche insgesamt mindestens 3000 Individuen beprobt.

Beim Erntegut erfolgte eine Probenziehung von fünf mal 80 g am laufenden Mähdrescher in zeitlich versetzten Abständen. Mit diesem Beprobungszeitpunkt, vor der Vermischung und Aufreinigung der Samen, sollten eventuelle Verteilungsunterschiede von transgenen und konventionellen Samen aufgedeckt werden.

Der Ausfallraps wurde nach Möglichkeit mit insgesamt 3000 Pflanzen pro Fläche beprobt. Zur Aufdeckung 'transgene Nester' erfolgte die großflächige Aufteilung der Felder in Beprobungsbereiche mit je 1000 Pflanzen. Es wurden zweimal jährlich Pflanzenproben genommen. Eine Probenziehung erfolgte im Frühjahr zwischen Saat und Nachauflauf-Herbizidbehandlung und eine im Herbst nach der Ernte und Bodenbearbeitung. Es wurden Keimpflanzen mit bereits ein bis zwei Paar ausgebildeten Laubblättern von ungefähr gleicher Größe gewählt. Bei größeren Pflanzen erfolgte die Entnahme von entsprechend gleich großen Blattstücken. Die Pflanzenproben wurden sofort auf Eis gekühlt, um die Kühlkette bis zur Gefriertrocknung aufrecht zu erhalten.

2.2.2 Aufarbeitung der Feldproben

Zur Konservierung wurde frisches Pflanzenmaterial nach einer Vorkühlung bei -20°C gefriergetrocknet (ALPHA 1-4; Martin Christ GmbH, D-Ostrode). Das getrocknete Material wurde anschließend mit einer Labormessermühle (Grindomix GM 200; Retsch GmbH & Co KG, D-Haan) zerkleinert, homogenisiert und aliquotiert. Bis zur DNA-Isolation wurde das pulverisierte Pflanzenmaterial luftdicht in Folie eingeschweißt und bei RT gelagert. Saatgutproben wurden auf 3500 Samen (entsprechend ihres Tausendkorngewichts) aliquotiert, zerkleinert, homogenisiert und bis zur DNA-Isolation bei -20°C eingefroren.

2.2.3 DNA-Isolation

Die Isolierung genomischer Raps-DNA erfolgte je nach Gewebe, bei grünem Pflanzenmaterial mit einer angepassten CTAB-Methode (AUSUBEL et al. 1999), bei Saatgut mit einer angepassten SDS-Methode (MANIATIS et al. 1989).

0,4 g gefriergetrocknetes Pflanzenmaterial wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 20 ml 1x CTAB-Puffer suspendiert und nach Zugabe von 250 μl β -Mercaptoethanol sowie 50 μl Proteinase K (20 mg/ml) für 60 min bei 60°C und leichtem Schütteln inkubiert. Die eisgekühlten Proben unterzogen sich einer zweimaligen Extraktion mit 1 Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) für jeweils 30 min in einem Überkopfschüttler.

Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei RT und Überführung der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß. Die DNA wurde mit 1 Volumen eiskaltem Isopropanol gefällt, zwei Waschschritten mit 1 ml 70%igem EtOH unterzogen und bis zur gewünschten Konzentration in 10 mM Tris-Cl-Puffer gelöst.

Die Einwaage von ca. 0,5 g gemahlenden Samenmaterials sowie die Suspendierung mit 10 ml 3,0x SDS und 50 µl Proteinase K (20 mg/ ml) erfolgte in einem 50 ml Reaktionsgefäß, gefolgt von einer 60 min Inkubation bei

60°C und leichtem Schütteln. Im Anschluss daran wurden die Proben einer doppelten Chloroform/ Isoamylalkohol-Extraktion (siehe S. 28) unterzogen und die wässrige Phase zur DNA-Fällung mit 1 Volumen Isopropanol bei RT versetzt. Die Entfernung von Lösungsmittelresten erfolgte über Lufttrocknung des fädigen DNA-Präzipitats nach dessen Überführung in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß. Zum RNA-Verdau wurde die getrocknete DNA in 500 µl Wasser plus 20 µl RNase A (10 mg/ ml) gelöst und 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine PEG-Fällung durch Zugabe von 1300 µl 28%iger PEG-Lösung, eine Inkubation über Nacht und eine 40 minütige Zentrifugation bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen, die DNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, nach zwei Waschschritten mit 1 ml 70%igem Ethanol luftgetrocknet und bis zur gewünschten Konzentration in 10 mM Tris-Cl-Puffer rückgelöst.

1,0 × CTAB-Puffer

1,0% (w/v)	CTAB
100 mM	Tris-Cl (pH 8,0)
10 mM	EDTA (pH 8,0)
700 mM	NaCl

3,0x SDS-Puffer

3,0% (w/v)	SDS
700 mM	NaAc (pH 5,2)
20 mM	EDTA (pH 8,0)
mit NaOH auf	pH 5,0

2.2.4 DNA-Quantifikation

Eine grobe Konzentrationsabschätzung genomischer und plasmidaler DNA-Lösungen erfolgte durch Elektrophorese von Aliquots auf 0,8 – 1,2%igen mit EtBr-gefärbten Agarosegelen (0,5 µg EtBr/ ml Agarose) und visuellem Abgleich über mitgeführte DNA-Molekulargewichtstandards. Die exakte Quantifizierung wurde über Doppelmessungen durch Anfärben der dsDNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen[®] vorgenommen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Storm[™] Fluorescence-Scanners und die Auswertung mit ImageQuant 5.0 (beides von Molecular Dynamics, USA-Sunnyvale). Die Quantifizierung wurde entsprechend den Empfehlungen von ROMPPANEN et al. (2000) über Interpolation einer mitgeführten DNA-Konzentrationsreihe durchgeführt.

2.2.5 Sequenzanalyse

Datenbanksichtung

Die Sequenzen wurden mit Hilfe der 'European Molecular Biology Laboratory' (EMBL) Sequenzdatenbank ausgewählt. Die untersuchten Transgensequenzen waren ein veränderter 35S-Promotor (P-35S) des CaMV (EMBL A18053 / WO9209696-A/4) und ein synthetisches Phosphinothricinacetyltransferase-Gen (*pat*-Gen; EMBL A99126/ EP0899340). Für den spezifischen Nachweis von *Brassica napus* wurden die 'house keeping' Referenzgene der S-glucosyltransferase (*s_gt*, EMBL A62529/ WO9716559) und der Phosphoenolpyruvat Carboxylase (*pepc3*, EMBL D13987/ BNPEPCASA) nach HELLEBRAND et al. verwendet (1998).

Sequenzierung

Die Sequenzierung von dsDNA fand nach der Kettenabbruchmethode von SANGER et al. (1970) statt. Es wurde der 'DYEnamic™ ET terminator cycle sequencing premix kit' mit der Thermo Sequenase DNA-Polymerase nach Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia, S-Uppsala) eingesetzt.

Sequenzanalyse

Die multifluore Detektion wurde auf einem ABI Prism™ 377 Sequenzer (Applied Biosystems, USA-Foster City) ausgeführt. Die Auftrennung der Sequenzierprodukte erfolgte in 5%igen Polyacrylamidgelen über vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Die

5%iges Polyacrylamidgel

10 % (v/v)	Acrylamid-Lsg. (50%)
6 M	Harnstoff
0,7‰ (v/v)	TEMED
0,5‰ (w/v)	Ammoniumpersulfat
1 ×	TBE-Puffer

gereinigten Sequenzierprodukte wurden in 1x Beladungspuffer des 'DYEnamic™ ET terminator cycle sequencing premix kits' rückgelöst, 3 min bei 95°C denaturiert und im 1 µl-Volumen eingesetzt. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer bei Laufzeiten von 7 h und 51°C und den elektrischen Parametern 120 W / 50 mA. Die Auswertung der DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Software Sequence Navigator™ 1.0.1 (Applied Biosystems, USA-Foster City). Sequenzen, die sich aus dem Einsatz von Vorwärts- und Rückwärtsprimern derselben Zielsequenz ergaben, wurden in Übereinstimmung (alignment) gebracht und mit entsprechenden Sequenzen der Datenbanken verglichen.

Restriktion

Die enzymatische Spaltung genomischer und plasmidaler DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen unter Berücksichtigung der Herstellerangaben (MBI Fermentas, D-St. Leon-Rot). Für die RFLP-Analyse wurde genomische DNA mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *BamHI*, *XbaI*, *HindIII* gespalten. Zur Inkubation von einem μg DNA im 20 μl Reaktionsansatz für 4 h waren 4U Enzym ausreichend. Für die Erstellung von plasmidalen Kalibrierstandards für die Real-Time PCR wurde plasmidale DNA mit den Restriktionsendonukleasen *NotI*, *PmeI* und *ScaI* linearisiert. Die Hydrolyse erfolgte mit 8U pro μg DNA für 4 h bei 37°C.

2.2.6 RFLP-Analyse

Gelelektrophorese

Die RFLP-Ansätze wurden in 1 \times Beladungspuffer über horizontale Gelelektrophorese in 0,8%igen Agarosegelen und mit ca. 1 V/cm aufgetrennt. TAE-Puffer fungierte als Laufpuffer bei Laufzeiten von 16-18 h. Zur visuellen Kontrolle der Auftrennung diente die Anfärbung des Beladungspuffers mit Bromphenolblau. Für die Geldokumentation des Restriktionsmusters mit dem UV-Transilluminators erfolgte eine Anfärbung der DNA-Fragmente mit EtBr (0,5 μg EtBr/ml H₂O).

TAE-Puffer

40 mM	Tris-Ac
1 mM	EDTA
pH 8,0	

10 \times Beladungspuffer

200 mM	EDTA
40 % (w/v)	Glycerin
0,03 % (w/v)	Bromphenolblau

Southern Blotting

Zur Fragmentanalyse wurde die denaturierte DNA unter Ausnutzung vertikaler Kapillarkräfte vom Agarosegel auf eine Nylonmembran übertragen. Die Apparatur des Southern Blotting war so aufgebaut, dass sich die Membran, die dem Gel aufliegt unter beschwertem Whatman Papier befand, das einen Kapillarsog erzeugte. Durch das Aufsteigen des denaturierenden Transferpuffers wurde die negativ geladene ssDNA bis an die positiv geladenen Membranoberfläche transportiert, wo sie gebunden wurde. Nach einer Transferzeit von ca. 16 h wurde die Membran kurz in 2 \times SSC neutralisiert, luftgetrocknet und für 2 h bei 80°C zur Fixierung der DNA gebacken. Die Aufbewahrung der Membran bis zur Hybridisierung erfolgte in Klarsichtfolie.

Transferpuffer

0,4 M	NaOH
0,6 M	NaCl

20 \times SSC

3,0 M	NaCl
0,3 M	Natriumcitrat
pH 7,0	

Radioaktive Sonden

Die Herstellung entsprechender Amplikons erfolgte mit Sequenz spezifischen Primern in der PCR. Nach der Aufreinigung mit dem 'QIAquick PCR Purification Kit' (Qiagen, D-Hilden) wurden die Amplikons nach dem 'random primed labeling' Verfahren von FEINBERG und VOGELSTEIN (1983) radioaktiv markiert. Die anschließende 5 min Inkubation bei 95°C diente der Denaturierung der markierten Insert-DNA (50 ng), gefolgt von einer Abkühlung auf Eis. Unter Einsatz von 1,4 Mbq [α -³²P] dCTP (3000 Ci/ mmol), 3 μ l AGT-Nukleotid-Mix, 2 μ l 10 \times Reaktionspuffer und 1 U Klenow-Enzym erfolgte der Einbau der Isotope im 20 μ l-Volumen 2 h bei 37°C. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über Sephadex-G50-Säulen abgetrennt. Die Effizienz des radioaktiven Einbaus wurde mit einem Szintillationszähler bestimmt.

AGT-Nukleotidmix

167 μ M	dATP
167 μ M	dGTP
167 μ M	dTTP

10 \times Reaktionspuffer

500 mM	Tris-Cl (pH 7,2)
100 mM	MgCl ₂
1 mM	DTT
2 mg/ml	BSA
62,5 A ₂₆₀ /ml	Hexanukleotide

Hybridisierung

Vor der ersten Benutzung wurden die Membrane 30 min in Waschlösung I zum Entfernen von Verunreinigungen inkubiert, gefolgt von einer vier stündigen Prähybridisierung mit Blockierungsreagenz im Drehinkubator (Bachhofer, D-Reutlingen) bei 65°C zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Die Hybridisierung mit der denaturierten Sonde und der angestrebten Radioaktivität von 1x 10⁶ cpm pro ml Hybridisierungsvolumen erfolgte ebenfalls bei 65°C im Drehinkubator über Nacht. Nach dem Verwerfen der radioaktiven Lösung sollte

Maleinsäure-Puffer

100 mM	Maleinsäure
150 mM	NaCl
pH 7,5	

Blocking-Lösung

10 % (w/v)	Blocking-Reagenz
in Maleinsäurepuffer	

(Prä)-Hybridisierungslösung

5 \times	SSC
10 % (w/v)	Blocking-Lsg.
0,1 % (w/v)	Natriumlauroylsarcosin
0,02 % (w/v)	SDS (2 \times kristallin)

Waschlösung I

1 \times	SSC
0,2 % (w/v)	SDS

Waschlösung II

0,1 \times	SSC
0,2 % (w/v)	SDS

Striplösung

0,2 N	NaOH
0,2 % (w/v)	SDS

eine Inkubation der Membran in Waschlösung I bzw. II, entsprechend der erforderlichen Stringenz, für 5-30 min bei ca. 60°C dem Entfernen unspezifisch gebundener Sonden-DNA dienen. Anschließend wurden die Membrane in Klarsichtfolie gegeben und mit einem röntgenempfindlichen Film (Quanta III, Du Pont) in einem Röntgenkasten mit Verstärkerfolie für 2-14 Tage bei -70°C exponiert. Die Wiederverwendung der Membranen war nach Behandlung mit alkalischer Striplösung zum Entfernen der Sonden-DNA bis zu zehn Mal möglich.

2.2.7 Rekombinante DNA-Techniken

Klonierung

Die gewünschten Fragmente wurden unter Verwendung Sequenz spezifischer Primer mittels PCR amplifiziert. Mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, D-Hilden) wurden die Amplikons nach Herstellerangaben aufgereinigt, in Wasser zurückgelöst und ihre Menge zur Berechnung des Transformationsansatzes bestimmt. Die Ligation erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 10 µl - 25 µl. Der unten stehenden Formel ist zu entnehmen, wie das Verhältnis von Insert und Vektor entsprechend den Angaben des Herstellers kalkuliert wurde.

$$X \text{ ng PCR -Produkt} = \frac{(Y \text{ bp PCR - Produkt}) \cdot (50 \text{ ng Vektor})}{(\text{Grösse in bp des Vektors})}$$

Die DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus* (Taq) hat eine Matrizen unabhängige terminale Transferaseaktivität, die zum Einbau eines 'überhängenden' Desoxyadenosins an das 3' Ende des Amplikons führt. Der Vektor pCR[®]4-Topo[®] (Invitrogen, D-Karlsruhe) ist linearisiert und besitzt am 3' Ende seiner TA-Klonierungsstelle den dazu komplementären T-Überhang. Die Insertion eines Amplikons wird durch eine Aktivierung des Vektors erleichtert. Die energiereiche Bindung zwischen dem 3' Phosphat des linearen Plasmids und dem Tyrosylrest der Topoisomerase I bietet eine Angriffsstelle für den 5'-Hydroxylrest des Inserts und ermöglicht eine effiziente Ligation (SHUMAN 1994). Bei Insertion von zwei PCR-Fragmenten wurde nach erfolgreicher Insertion in die TA-Klonierungsstelle ein weiteres Insert in die 'glatte' *Pme*I-Restriktionsschnittstelle des Vektors ligiert. Die PCR-Produkte wurden mit der *Pfu* DNA-Polymerase amplifiziert, die keine dATP addiert und bei 65°C für 30 min mit der PNK phosphoryliert. Zur Vermeidung einer partiellen Selbstligation des Vektors wurde dieser nach *Pme*I-Restriktion mit der alkalischen Phosphatase für 30 min bei 37°C dephosphoryliert. Die Ligation 'glatter' Enden wurde mit der T4 DNA Ligase bei 16°C für 24 h vorgenommen. Alle Reaktionen erfolgten nach Herstellerangaben.

Transformation von Bakterien

Die Transformation erfolgte mit Hilfe von chemisch kompetenten One shot[®] TOPO10 *E. coli* Bakterienzellen (Invitrogen, D-Karlsruhe), die auf Eis aufgetaut worden waren. Die Zellen wurden vorsichtig mit dem Ligationsansatz gemischt und 30 min auf Eis gehalten. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 30 s wurden die Zellen 5 min auf Eis abgekühlt und mit 120 µl 37°C warmem SOC-Medium versetzt. Sie wurden anschließend 1 h horizontal geschüttelt, in Aliquots von 50-200 µl auf Indikatorplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Da die Selbstligation der pCR[®]4-TOPO[®]-Plasmide (Invitrogen, D-Karlsruhe) durch Aktivierung eines Letalgens verhindert wird, wurden alle überlebenden Klone selektiert.

<u>SOC-Medium</u>	<u>LB-Medium flüssig</u>	<u>Indikatorplatten</u>
2,0 % (w/v) Trypton	1,0 % (w/v) Trypton	LB-Medium fest
0,5 % (w/v) Hefeextrakt	0,5 % (w/v) Hefeextrakt	1,5 % (w/v) Bacto-Agar
10 mM NaCl	0,5 % (w/v) NaCl	
2,5 mM KCl		
10 mM MgCl ₂		
10 mM MgSO ₄		
20 mM Glucose		
→autoklavieren	→ autoklavieren	→ autoklavieren
75 µg/ml Ampicillin	120 µg/ml Ampicillin	75 µg/ml Ampicillin

Nach der Selektion wurden die Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher in Glasröhrchen à 5 ml flüssigem LB-Medium transferiert und über Nacht angezogen. Die Lagerung der Bakterien erfolgte in einer 15%igen Glycerinlösung bei -70°C (MANIATIS et al. 1989). Dazu wurden 250 µl Bakterien in flüssigem LB-Medium auf Eis gekühlt, mit 750 µl 70%igem Glycerin gemischt und eingefroren.

Plasmid-DNA wurde nach BIRNBIOM und DOLY (1979) mit dem 'High Pure Plasmid Isolation Kit' (Roche, D-Mannheim) isoliert. Für eine Verwendung in Real Time PCR-Reaktionen wurde die Plasmid-DNA in 10 mM Tris-Cl-Puffer gelöst, für die Sequenzierung in H₂O_{bidest.}

2.2.8 Qualitative PCR

Die DNA-Amplifikation erfolgte durch Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase (SAIKI et al. 1988) auf einem 9600 PCR-Cycler (Applied Biosystems, USA-Foster City). Die Ableitung der Sequenz spezifischen Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Primer Premier 4.04 (Primer Biosoft International, USA-Palo Alto), wobei ein GC-Gehalt von 40-60% und eine Primerlänge von 20-24 bp angestrebt wurde. Die PCR-Produkte wurden ent-

sprechend des gewünschten Auflösungsgrades in 1,5 - 3,0%igen Agarose MetaPhor-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Beim Auftreten unspezifischer Nebenbanden oder einer zu geringen Reaktionseffizienz wurde die Annealingtemperatur in 2°C-Schritten variiert und/ oder die Mg²⁺-Konzentration des Reaktionspuffers von 1,5 mM auf bis zu 3,0 mM erhöht. Um Kontaminationen mit Fremd-DNA auszuschließen, wurde bei jedem PCR-Experiment eine H₂O-Kontrolle mitgeführt. Bei PCR-Experimenten zum Transgennachweis wurde zudem DNA der transgenen bzw. nicht-transgenen Variante der entsprechenden Pflanzenart als Positiv- bzw. Negativkontrollen mitgeführt.

<u>PCR mit <i>Taq</i>-Polymerase</u>		<u>PCR-Parameter</u>		
5-50 ng	DNA-Matrize	95°C	10 min	1 Zyklus
0,2 µM	Vorwärtsprimer	95°C 60°C 72°C	30 s 1 min 2 min	} 30 Zyklen
0,2 µM	Rückwärtsprimer			
200 µM	dNTPs			
0,4 U	AmpliTaq Gold Polymerase			
1 ×	PCR-Puffer			
ad	20 µl	72°C	10 min	1 Zyklus

<u>PCR mit <i>PfU</i>-Polymerase</u>		<u>PCR-Parameter</u>		
20-50 ng	DNA-Matrize	94°C	1 min	1 Zyklus
0,2 µM	Vorwärtsprimer	94°C 60°C 72°C	30 s 30 s 1 min	} 30 Zyklen
0,2 µM	Rückwärtsprimer			
200 µM	dNTPs			
1,5 U	<i>PfU</i> -Polymerase			
1 ×	PCR-Puffer			
ad	20 µl	72°C	10 min	1 Zyklus

2.2.9 Quantitative Real Time PCR

Real Time PCR-Bedingungen

Die Durchführung der Real-Time PCR erfolgte auf einem ABI® Prism™ 7700 SDS (TaqMan®, Applied Biosystems, USA-Foster City). Die Monoplexreaktionen wurden in einem Volumen von 25 µl mit 1x TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA-Foster City) vorgenommen mit je 400 µM von je dATP, dCTP, dGTP, 800 µM dUTP, 0,2 U UNG (AmpErase Uracil N-glycosylase) und 1 U Ampliqa Gold DNA Polymerase. Nach einem Dekontaminierungsschritt bei 50°C für 2 min zum Abbau eventuell vorhandener uracil-

<u>TaqMan[®] Real Time PCR</u>		<u>Zyklusprofil</u>		
5-200 ng	DNA-Matrize	50°C	2 min	} 1 Zyklus
0,3 µM	Vorwärtsprimer	95°C	10 min	
0,3 µM	Rückwärtsprimer			
0,2 µM	Sonde			} 45 Zyklen
1 × TaqMan [®] PCR-Master Mix (Applied Biosystems)		95°C	15 s	
ad	25 µl	60°C	1 min	

haltiger Amplikons einer vorhergehenden Real-Time PCR schloss sich ein kombinierter Annealing- und Extensionsschritt an, entsprechend der Empfehlung von Applied Biosystems (USA-Foster City).

Design und Optimierung von Real-Time PCR Assays

Die Ableitung der Sequenz spezifischen Oligonukleotide erfolgte mit der Software Primer Express[™] Version 1.5 nach den Empfehlungen von Applied Biosystems (USA-Foster City). Die Sonde wurde so platziert, dass sie eine Länge von 20-30 bp umfasste, wobei ihre T_m 5-10°C über der T_m der Primer lag. Lies die vorliegende Sequenz nicht die Einhaltung beider Bedingungen zu, kam eine MGB-Sonde ('minor groove binder') zum Einsatz. Die MGB-Sonden integrieren nach KUTYAVIN et al. (2000) mit ihrer halbmondförmigen DPI₃-Gruppe in die terminalen 5-6 bp der 'kleinen Furche' des entstehenden Doppelstranges und bilden somit stabile Duplexe mit der Ziel-DNA.

Die Platzierung des Quenchers TAMRA (582 nm) war am 3'-Ende der Sonden, die des Reporterfarbstoffs FAM (518 nm) bzw. VIC (552 nm) am 5'-Ende (vgl. Tabelle 2-4). Die Wahl der fluorogenen Farbstoffe erfolgte so, dass ihre Emissionsspektren (E_m) möglichst weit auseinander lagen. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass kein Guanin am 5'-Ende der Sonde lag, keine Komplementarität zwischen den gemeinsam verwendeten Oligonukleotiden bestand, der GC-Gehalt der Sonde zwischen 40-60% lag und weder Sekundärstrukturen noch repetitive Sequenzen in der Zielsequenz vorlagen. Der Abstand zwischen TaqMan[®]-Sonden und Vorwärtsprimern war stets auf 1-2 bp minimiert, um eine möglichst hohe Prozessionsrate der Taq-Polymerase in der PCR zu gewährleisten.

Für alle Assays erfolgte die Erstellung einer Primermatrix, bei der Vorwärts- und Rückwärtsprimer in Konzentrationen von 50 nM, 300 nM, 900 nM in der Real-Time PCR kombiniert wurden. Die Wahl fiel auf die Konzentrationskombination, welche die höchste PCR-Effizienz erzielten.

Alle Assays wurden nach der Entwicklung auf unspezifische Nebenprodukte, Artefakte sowie Primerdimere untersucht. Die Erkennung von PCR-Produkten, die sich aufgrund differenter GC/AT-Verhältnisse, Amplikonlängen oder Sequenzen in der Dissoziations-Temperatur unterschieden, erfolgte durch eine Schmelzkurvenanalyse nach RIRIE et al. (1971). Im Anschluss an die Real-Time PCR wurden den Reaktionsansätzen die gleichen Mengen eines 2x SYBR Green[®] PCR Master Mix (E_m : 610 nm; Applied Biosystems, USA-Foster City) zugegeben. Für die Schmelzkurvenanalyse erfolgte eine Aufschmelzung des zuvor entstandene Produkts durch eine langsame Erhöhung der Temperatur mittels TaqMan[®]. Der Unterscheidung von PCR-Produkten gleicher Dissoziations-Temperatur, aber unterschiedlicher Basenpaarlänge, diente die Auftrennung der Real Time PCR-Ansätze mit 4%igen MetaPhor-Agarosegelen (0,5 µg EtBr/ ml Agarose) über Gelelektrophorese.

Die von der Software vorgeschlagenen Ct-Werte und Basislinien wurden anhand der Kurvenverläufe visuell geprüft und ggf. korrigiert. Bei Fluoreszenzschwankungen in den Anfangszyklen erfolgte eine Erweiterung der Basislinie nach Herstellerempfehlungen.

Erstellung von Kalibrierstandards

Der Methodvalidierung dienten verschiedene Kalibrierstandards. Die Herstellung der 'gemischten Samenstandards' (MS-Standards) erfolgte durch eine Mischung von Saatgut der LL-Transformationslinie 'Modul' ('Falcon GS40/90') mit Saatgut der nicht-transgenen Ausgangsline 'Falcon'. Entsprechende Samenmengen wurden gezählt, vermischt und vermahlen. Nach der DNA-Isolation erfolgte ein Abgleich der DNA-Konzentration der verschiedenen Stufen.

Alle anderen Standards wurden durch serielle Verdünnung oder Vermischung in 1: 10 Verhältnissen auf DNA-Ebene erzeugt, wodurch der Transgenanteil von Stufe zu Stufe um das Zehnfache abnahm. Der Produktion 'verdünnter genomischer Standards' (VG-Standards) diente eine stufenweise Wasserverdünnung von DNA der Transformante 'Modul' bzw. ihre stufenweise Mischung mit nicht-transgener 'Falcon'-DNA bei den 'gemischten genomischen Standards' (MG-Standards).

Die Produktion plasmidaler Standards erfolgte mit *ScaI*-linearisierten Plasmiden. Plasmide mit der P-35S-*pat*-Übergangsregion des LL-Konstruktes sowie einer partiellen Sequenz des endogenen *s_{gt}*-Referenzgens wurden zur Erzeugung der 'verdünnten Plasmidstandards' (VP-Standards) seriell mit sterilem H₂O_{bidest} verdünnt. Plasmide, die ausschließlich das LL-Konstrukt integriert hatten, dienten als 'gemischte plasmidale und genomische Standards' (MPG-Standards) durch stufenweise Vermischung mit genomischer 'Falcon' -DNA.

Die Einstellung der DNA-Konzentration der Plasmide erfolgte entsprechend dem Arbeitsbereich der genomischen Kalibrierstandards.

Die Ableitung der Kopienzahl der Plasmide geschah über ihre DNA-

$$G\ddot{A} = \frac{N_A \cdot x \text{ g}}{y \text{ bp} \cdot 660 \text{ g/mol}}$$

$G\ddot{A}$ = Genomäquivalent, entspricht der Kopienzahl

N_A = $6.023 \cdot 10^{23}$ Teile/ mol

$x \text{ g}$ = DNA-Menge / Gramm

$y \text{ bp}$ = Menge / Basenpaare (Plasmid + Insert)

660 g/mol = gemittelte molare Masse der dNTPs von ddDNA

Menge und das plasmidale Molekulargewicht (MÜLHARDT 2000). Mit Hilfe der Menge genomischer Raps-DNA und der Masse von 1,225 pg (ARUMUGANATHAN und EARLE 1991) pro haploidem Rapsgenomäquivalent wurde die Kopienzahlen der genomischen Zielsequenz berechnet. Bei der Ableitung der Kopienzahlen erfolgte eine Berücksichtigung der Doppelinsertion des Transgenkonstrukts pro haploidem Genom der Rapsorte 'Falcon GS40/90'.

Quantifizierung

Neben der absoluten wurde auch eine relative Quantifizierungsstrategie durchgeführt, bei welcher die Normalisierung der ermittelten *pat*-Kopien durch die *s_gt*-Kopien erfolgte, um den Transgenanteil im Verhältnis zur Gesamtkopienzahl des Genoms anzugeben. Die absoluten *pat*- und *s_gt*-Kopienzahlen unbe-

$$\hat{y} = b_0 + b_1 \cdot x_i$$

\hat{y} = abhängige Variabel: Ct-Wert

b_0 = Steigung

b_1 = Achsenabschnitt

x_i = unabhängige Variabel: log Kopienzahl

kannter Proben wurden über Interpolation in eine linearen Regression der Kalibrierstandards bestimmt. Dazu diente die Darstellung des 'Logarithmus der Kopienzahl' und der zugehörigen 'Ct-Werte' der Standards in einem zweidimensionalen Koordinatensystem sowie die Anpassung der Punktwolke an eine linearen Regression nach der 'Methode der kleinsten Quadrate' (SACHS 1999). Bei gemischten Standards mit hoher *s_gt*- und niedriger *pat*-Kopienzahl konnte die Δ Ct-Methode verwendet werden. Mit der Δ Ct-Methode erfolgte die Berechnung einer Regression direkt aus der Differenz von Ct_{pat} und Ct_{s_gt} mit dem Logarithmus (log) des Transgenanteils der Standards (TERRY und HARRIS 2001).

Validierungsparameter

Zur Validierung einer Quantifizierung von Genkopienzahlen über verschiedene Kalibrierstandards mit der Real-Time PCR wurden verschiedene statistische Parameter erhoben. Da die Präzision der Schätzung statistischer Parameter mit der Anzahl der Wiederholungen zunimmt, erfolgte die Bestimmung der Kalibrierstandards in fünf Wiederholungen und die der Proben in Doppel- oder Dreifachmessungen. Ein Maß für die Präzision einer Schätzung ist das Vertrauensintervall (VI). Mit zunehmender Breite eines VI nimmt die Präzision ab. So verbreitert sich das VI um ein fünffaches bei drei Wiederholungen anstelle von fünf durch die Freiheitsgrade (f) des Studentfaktors (t) (vgl. Formel S. 42 'Vertrauensintervalle für Genkopienzahlen').

Einer Gültigkeitsprüfung der Analyse diente die Auswertung mitlaufenden Leerwerte (NTC), sowie bei Transgennachweisen die Positiv- und Negativkontrollen von DNA transgener bzw. nicht-transgener Pflanzensorten. Die Schätzung der statistischen Parameter Mittelwert (\bar{x}), Varianz (s^2), Standardabweichung (s) und VI erfolgte auf dem Niveau der errechneten Kopien. Zur Beurteilung der Real Time PCR-Quantifizierung von Genkopienzahlen über Kalibrierstandards wurden folgende statistische Maßzahlen errechnet:

Korrelationskoeffizient

Der Korrelationskoeffizient R^2 ist ein Maß für den Grad der Anpassung des mathematischen Modells an die experimentell ermittelten Werte sowie die Güte der Korrelation (SACHS 1999). Nach Anpassung einer linearen Regression an die 'Ct-Werte' und den 'log der Kopien' der Verdünnungsstufen der Kalibrierstandards sollte nach WAIBLINGER et al. (2001) der Korrelationskoeffizient 98% überschreiten.

Variationskoeffizient

Zum Vergleich der relativen Standardabweichungen von Merkmalen mit verschiedenen Mittelwerten dient V , der Variationskoeffizient (SACHS 1999). Er ist das Verhältnis von Standardabweichung zum Mittelwert.

$$V = \frac{s}{\bar{x}}$$

V = Variationskoeffizient
 s = Standardabweichung
 \bar{x} = Mittelwert

Effizienz der Real Time PCR

Die Effizienz (E) der Real-Time PCR lässt sich über die Steigung der Regressionsgeraden der PCR (vgl. S. 38, Quantifizierung) bestimmen. Die Steigung wird aufgrund der exponentiell verlaufenden PCR-Reaktion durch die nebenstehende Gleichung beschrieben.

$$E = 10^{-1/b_0} - 1$$

E = Effizienz

b_0 = Steigung der Regressionsgeraden

Ausreißertest nach Dixon

Die Ermittlung von Ausreißern erfolgte nach dem Ausreißertest von Dixon. Nachdem die Ct-Werte der Größe nach geordnet waren, wurden die größten bzw. kleinsten Werte als Ausreißer eliminiert, wenn der Prüfwert den Tabellenwert 0,642 für $n=5$ und $\alpha = 0,05$ überstieg (ANONYMOUS 2002).

Prüfwerte für Ausreißer

nach oben:

nach unten:

$$\frac{x_{(2)} - x_{(1)}}{x_{(n)} - x_{(1)}}$$

$$\frac{x_{(n)} - x_{(n-1)}}{x_{(n)} - x_{(1)}}$$

$$x_{(n)} - x_{(1)}$$

$$x_{(n)} - x_{(1)}$$

x = Messwerte pro Wiederholung

n = größter Messwert

Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate (W) dient als Maß der Richtigkeit und Robustheit aller Analyseschritte unter den gewählten experimentellen Bedingungen (KROMIDAS 1999) und wurde als Verhältnis des gemittelten, gemessenen Transgenanteils zum erwarteten Transgenanteil in % erhoben.

$$W = \frac{\bar{x}}{x_E} \cdot 100\%$$

W = Wiederfindungsrate

\bar{x} = Mittelwert gemessener Transgenanteile (%)

x_E = erwarteter Transgenanteil (%)

F-Test zum Vergleich zweier Varianzen

Bei VG- und VP-Standards erfolgte die Erhebung eines F-Tests auf Homogenität (H) der Varianzen gemessener *pat*- und *s_gt*-Kopien pro Konzentrationsniveau mit $H_0: s_{pat}^2 = s_{s_gt}^2$ (Hypothese: Varianzen der *pat*- und *s_gt*-Kopien sind gleich) gegen $H_1: s_{pat}^2 \neq s_{s_gt}^2$ (Hypothese: Varianzen der *pat* und *s_gt*-Kopien sind ungleich). Damit der Prüfwert $F > 1$ ist, wurden die Proben so sortiert, dass die größere Varianz im Zähler steht.

Bei fünf Messungen gelten die Varianzen als ungleich, wenn der Prüfwert F den Tabellenwert 9,60 übersteigt (DIN 53804-1, DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG 1990, 2002). Nach Ablehnung von H_0 , erfolgte der t-Test zum Vergleich zweier Erwartungswerte.

Prüfwert:

$$F = \frac{s_2^2}{s_1^2}$$

F = F-Verteilung

f = Freiheitsgrad

s^2 = Varianz

α = Signifikanzniveau

1, 2 = Indizes für Nenner, Zähler ($2 > 1$)

Tabellenwert:

$$F_{f1; f2; \alpha/2}$$

t-Test zum Vergleich zweier Erwartungswerte

Bei VG- und VP-Standards wurde die Hypothese H_0 : 'Die erwarteten *pat*- und *s_gt*-Genkopienzahlen sind gleich' gegen die Alternativhypothese H_1 : 'Die erwarteten *pat*- und *s_gt*-Genkopienzahlen sind verschieden', mit einem t-Test für den 'Vertrauensbereich der Differenz zweier Erwartungswerte unabhängiger Stichproben' mit gleichen Varianzen nach DIN 53804-1 (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMIERUNG 1990, 2002) geprüft. Erwiesen sich sowohl Varianzen als auch Erwartungswerte der *pat*- und *s_gt*-Kopien als verschieden, war eine Anwendung der ΔCt -Methode nicht gerechtfertigt.

Mit einem heteroskedastischen Zweiprobent-Test zum Vergleich zweier Erwartungswerte mit ungleichen Varianzen (Microsoft, Excel 2000) wurde der Unterschied der gemessenen LibertyLink® (LL) Transgenanteile der transgen kontaminierten Agrarflächen zwischen den Vegetationsperioden auf Signifikanz überprüft.

Prüfwert:

$$t = \frac{\bar{x}_{pat} - \bar{x}_{s_gt}}{s^*}$$

t = T-Verteilung

\bar{x} = Mittelwert (*pat*; *s_gt*-Kopien)

$t_{f,\alpha}$ = Studentfaktor mit $\alpha = 0,05$ und $f = n_{pat} + n_{s_gt} - 2$ Freiheitsgraden

α = Signifikanzniveau

n = Gesamtzahl der Messungen

s^* = Varianz der Differenz zweier Erwartungswerte (*pat*; *s_gt*-Kopien)

$$s^* = \sqrt{\frac{\frac{n_{pat} - 1}{n_{pat} + n_{s_gt} - 2} s_{pat}^2 + \frac{n_{s_gt} - 1}{n_{pat} + n_{s_gt} - 2} s_{s_gt}^2}{\frac{1}{n_{pat}} + \frac{1}{n_{s_gt}}}}$$

s^2 = Varianz (*pat*- *s_gt*-Kopien)

Tabellenwert:

$$t_{f; 1-\alpha}$$

Vertrauensintervalle für Genkopienzahlen

Die Breite des Vertrauensintervalls (VI), innerhalb dessen der 'tatsächliche' Wert mit einer bestimmten statistischen Wahrscheinlichkeit liegt, ist ein Maß für die Präzision der Schätzung. Die Präzision hängt von der gewünschten Sicherheit ($1 - \alpha$) der Schätzung, dem Stichprobenumfang (m) sowie dem Standardabweichung (s) der Stichprobenstatistik ab.

Die Komplementärwahrscheinlichkeit der Sicherheit, die Unsicherheit der Schätzung, ist die Irrtumswahrscheinlichkeit (α). Für eine Schätzung der erwarteten Genkopienzahl, des arithmetischen Mittelwertes (\bar{x}), wird die 'T-Verteilung' verwendet, wenn die Streuung des untersuchten Merkmals in der Grundgesamtheit unbekannt ist und mit den Stichprobendaten geschätzt wird.

$$VI_{(95\%)} = \bar{x} \pm \frac{s \cdot t_{f;a} \cdot 100}{\sqrt{m \cdot \bar{x}}}$$

- VI = relatives Vertrauensintervall
 \bar{x} = Mittelwert (Kopien)
 s = Standardabweichung vom Mittelwert (Kopien)
 $t_{f,\alpha}$ = Studentfaktor mit $\alpha = 0,05$ und mit f ($m - 1$) Freiheitsgraden
 m = Anzahl der Wiederholungen pro Konzentrationsniveau
 a = Signifikanzniveau

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweisgrenze (NG) ist die kleinste Menge oder Konzentration, die mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision noch nachgewiesen werden kann. Die Bestimmungsgrenze (BG) ist die Menge, die unter diesen Parametern noch quantitativ erfasst werden kann (KROMIDAS 1999). In der Real Time PCR-Analytik ist die NG die kleinste noch nachweisbare und die BG die kleinste quantifizierbare Genkopienzahl.

Mit Hilfe der DIN 32 645 (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG 1994) können NG und BG exakt unter Verwendung von Kalibrierstandards bestimmt werden. Die Präzision wird hierbei nicht von der Standardabweichung (s) des Kopienmittelwerts (vgl. VI) abgeleitet, sondern von der 'Reststandardabweichung der Messwerte um die Kalibrierung' ($s_{x.o}$). Die Variablen wurden zur Anwendung des linearen Regressionsmodells auf der Ebene von log Kopien berechnet und im letzten Schritt in Kopienzahlen umgerechnet.

$$x_{NG} = s_{x.o} \cdot t_{0a} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}}$$

- x_{BG} = $k \cdot x_{NG}$
 x_{NG} = log Kopien an der NG
 x_{BG} = log Kopien an der BG
 $t_{f,\alpha}$ = Studentfaktor mit $\alpha = 0,05$ und mit f ($n-2$) Freiheitsgraden
 m = Anzahl der Wiederholungen pro Konzentrationsniveau
 n = Gesamtzahl der Messungen
 Q_x = Summe der Abweichungsquadrate (log Kopien) von der Kalibrierung
 \bar{x} = Mittelwert von n (log Kopien)
 k = 3, relative Ergebnisunsicherheit der BG
 $s_{x.o}$ = Abweichung (log Kopien) von der Kalibriergeraden
- $$s_{x.o} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}}{n - 2} \cdot b_0$$
- b_0 = Steigung der Regressionsgeraden
 \hat{y}_i = geschätzter Ct-Wert
 y_i = Ct-Messwert

3 ERGEBNISSE

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen eines bayerischen Monitoringprojektes für gentechnisch veränderten Raps durchgeführt. Ihr Ziel war die Entwicklung von PCR-Verfahren zum Nachweis der transgenen Rapslinie 'Falcon GS40/90', der die Insertion des *pat*-Gens eine Toleranz gegen das Herbizid Liberty[®] (LibertyLink[®] Raps, LL-Raps) verleiht.

Zu diesem Zweck sollten PCR-Verfahren entwickelt und vergleichend evaluiert werden, die sich aufgrund ihres Zielgens in der Spezifität unterscheiden. Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Entwicklung eines hochspezifischen PCR-Verfahrens zum Nachweis des transgenen LL-Konstruktes, das die quantitative Bestimmung von LL-Raps in Mischproben erlaubt. Ein solcher PCR Assay besitzt eine hohe Spezifität gegenüber einer bestimmten GVP-Linie und minimiert zugleich das Auftreten Falschpositiver. Für die LL-Rapssorte 'Falcon GS40/90' wurde bislang kein solcher PCR Assay beschrieben.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung robuster und sensitiver DNA-Kalibrierstandards zur Optimierung der PCR-Verfahren. Im Hinblick auf die aktuelle Gesetzeslage mit Schwellenwerten unter 1% für unbeabsichtigte GVP-Beimischungen in Lebens- und Futtermittelzutaten, sollte zudem eine Validierung der PCR-Empfindlichkeit bezüglich Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgen.

Als erste Anwendung und praxisnahe Evaluierung der entwickelten PCR Systeme konnten Feldproben bayerischer Praxisflächen analysiert werden, auf denen versehentlich ein ungewohnter Anbau von herbizidtolerantem Raps erfolgt war.

3.1 Entwicklung molekularer Nachweissysteme für LibertyLink[®] Raps

3.1.1 Spezifischer Nachweis von *Brassica* Strukturgenen

Zur Normalisierung der PCR-Signale der Transgensequenzen wurde nach geeigneten Referenzgenen in *Brassica napus* gesucht. Die Auswahlkriterien waren eine hohe Spezifität bezogen auf die Pflanzenart und eine möglichst geringe Kopienzahl pro haploidem Genom. Die Zielsetzung war die Entwicklung eines spezifischen Referenzsystems für den amphidiploiden Arthybriden *B. napus*, das gleichzeitig für die Ausgangsarten Kohl und Rüben nicht sensitiv ist. Zu diesem Zweck wurden zwei Referenzsysteme für *B. napus* gewählt, basierend auf der Gensequenz der Phosphoenolpyruvat Carboxylase (PEPC) und der S-Glucosyltransferase (*S_gt*). Beide Gene dienen der Ableitung eines TaqMan[®] Assays mit anschließender Validierung der Sensitivität und Linearität in der Real Time PCR.

PCR Assay für das Phosphoenolpyruvat Carboxylase-Gen

Nach HELLEBRAND et al. (1998) ist der spezifische Nachweis von *B. napus* über das Gen für die PEPC möglich. Das Rapsgenom besitzt mehrere PEPCasen, deren Nukleotidsequenzen sich stark ähneln. Die Autoren fanden jedoch heraus, dass das Gen für die PE3-PEPC eine hoch spezifische Struktur besitzt: Exon 7 und Exon 8 sind nicht wie bei den PE15-, PE105- und PE19-PEPC-Genen durch ein Intron unterbrochen. Das PE19-PEPC-Gen weist zusätzlich eine Deletion in Exon 8 auf. Daraus wurde abgeleitet, dass das PE3-PEPC-Gen nur in geringer Kopienzahl und wenigen *Brassica*-Arten vorliegt. Die Sequenzen der PEPC-Gene konnten aus der EMBL-Datenbank bezogen werden (EMBL: D26382/ BNPE19G, D26378/ BNPE15C, D26380/ BNPE10E).

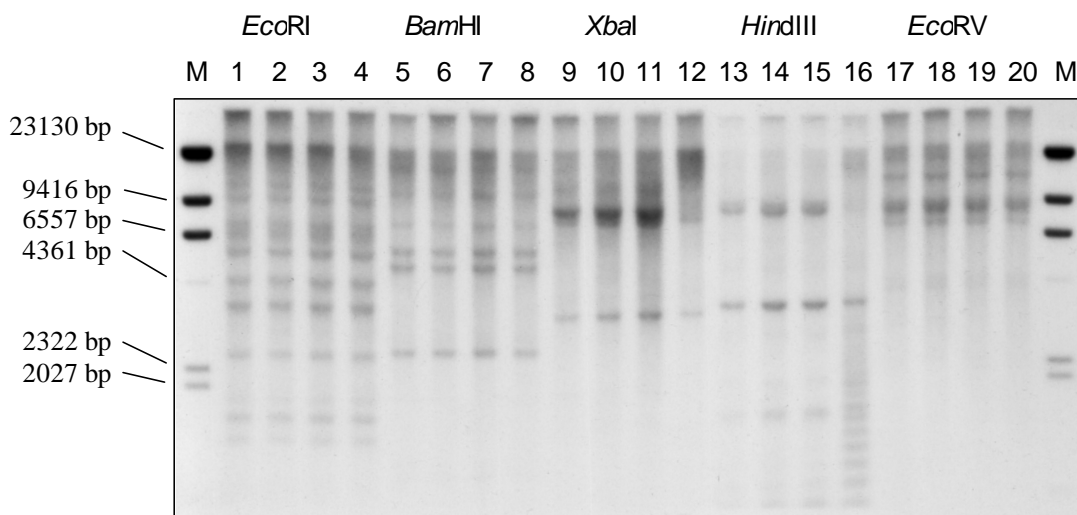


Abbildung 3-1: RFLP-Analyse genomischer Raps-DNA mit einer *pepc3*-Gen spezifischen Sonde (1, 5, 9, 13, 17) 'Modul', (2, 6, 10, 14, 18) 'Falcon', (3, 7, 11, 15, 19) 'Avalon', (4, 8, 12, 16, 20) 'Artus'; (M) Längenstandard λ Hind III.

Oligonukleotide zur spezifischen Amplifikation eines 411 bp Fragments aus dem Exon 7 des PE3-PEPCase-Gens (EMBL D13987/ BNPEPCASA) wurden so abgeleitet, dass sie in den anderen PEPC-Genen nicht vorkommen. In der qualitativen PCR zeigte sich eine Spezifität des PE3-PCR Assays gegenüber Raps und Rübsen. Gelbsenf und Ölettrich konnten dagegen nicht amplifiziert werden. Somit wurde der PE3-PCR Assay als spezifisch für nahe Rapsverwandte der Gattung *Brassica* eingestuft.

Die Schätzung der Kopienzahl der Referenzsequenzen erfolgte mit der RFLP-Analyse. Die geschnittene DNA der Rapsorten 'Falcon', 'Artus', 'Modul' und 'Avalon' wurde mit Sonden hybridisiert, die aus den radioaktiv markierten PCR-Produkten der LL-Sorte 'Modul' mit den Primern PE-for / PE-rev gewonnen waren. Es zeigten sich drei (*XbaI*), vier (*HindIII*, *EcoRV*), fünf (*BamHI*) bzw. neun (*EcoRI*) diskrete Banden für alle Genotypen (Abbildung

3-1). Daraus ergab sich die Einstufung des *pepc3* als 'low-copy' Gen. Die genaue Kopienzahl ist aufgrund möglicher Homologien zu anderen Sequenzen des *Brassica*-Genoms mit der RFLP-Analyse nicht exakt bestimmbar. Bei der Sorte 'Artus' (*Xba*I, *Hind*III) zeigten sich Abweichungen im Hybridisierungsmuster (Abbildung 3-1, Spur 16). Da diese Abweichungen bei der Hybridisierung mit anderen RFLP-Sonden auch auftraten, sind sie wahrscheinlich das Resultat einer partiellen Restriktion. Die Kopienzahl des PE3-PEPcase-Gens (*pepc3*) wurde als niedrig genug erachtet, um als Referenzsystem in der Real-Time PCR verwendet zu werden.

Real-Time PCR Assay für das Phosphoenolpyruvat Carboxylase-Gen

Für die selektive Detektion und Quantifizierung des PE3-PEPCase Gens wurde bei der Auswahl der Oligonukleotide des Real-Time PCR Assays die spezifische Anordnung der Exons 7 und 8 genutzt, da in diesem Sequenzbereich Unterschiede zwischen den homologen Genen PE-15, PE-19 und PE-105 bestehen.

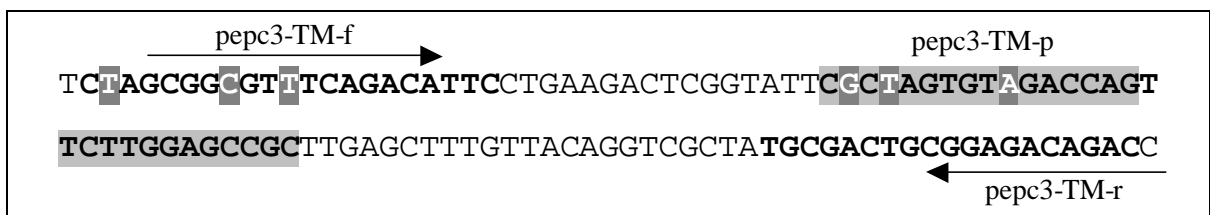


Abbildung 3-2: Positionierung von Primern und Sonde des Real Time *pepc3*-Referenz PCR Assays. Oligonukleotide des Real-Time PCR Assays für das Phosphoenolpyruvat Carboxylase Gen 3 (*pepc3*-TM) sind fett markiert, der Sondenbereich ist hellgrau hinterlegt, Punktmutationen bei *B. napus* sind in weißer Schrift gehalten und dunkelgrau hinterlegt, die Übergangsregion innerhalb der Sonde ist nicht grau hinterlegt.

Die PCR-Fragmente, die mit Hilfe des spezifischen Primerpaars PE-for/ PE-rev für das *pepc3*-Gen aus genomischer DNA der Rapsorte 'Falcon' und einer Sommerrübensorte amplifiziert worden waren, wurden für einen Sequenzvergleich direktsequenziert und untereinander abgeglichen. Im sequenzierten Bereich von 411 bp konnten außerhalb der Primerregion 28 Punktmutationen von *B. napus* und acht von *B. rapa* gegenüber der Sequenz der EMBL-Datenbank festgestellt werden. Vier dieser Punktmutationen waren bei *B. napus* und *B. rapa* identisch. Drei Punktmutationen lagen bei Raps im Bereich der Sonde und drei im Bereich des Vorwärtsprimers (siehe Abbildung 3-2).

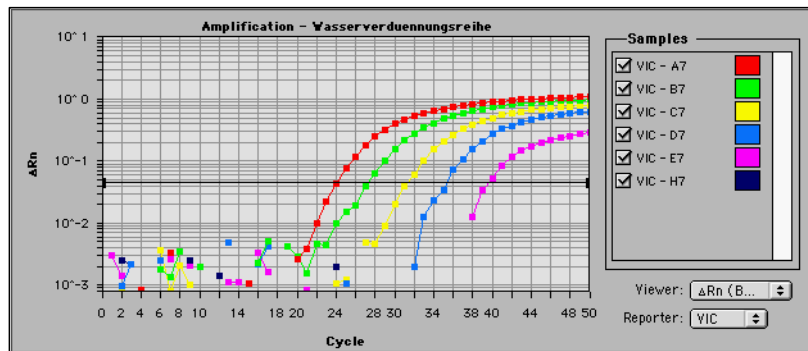


Abbildung 3-3: Amplifikationsplots zur Kalibrierung des Real Time *pepc3*-Referenz PCR Assays DNA-Verdünnungsstufen der LL-Rapssorte 'Modul': (A7) 26 531 Kopien, (B7) 2 653 Kopien, (C7) 265 Kopien, (D7) 27 Kopien, (E7) 2,7 Kopien, (H4) H₂O; Kalibrierfunktion: $y = 45,5 - 3,91x$; $R^2 = 0,997$

Eine Überprüfung der Spezifität des Real-Time PCR Assays *pepc3*-TM mit je zwei Sorten von *B. napus* ('Modul', 'Falcon'), *B. rapa* (Sommer-, Winterrüben), *Sinapsis alba* und *Raphanus sativus oleiferus* (Ölrettich) ergab, dass außer *S. alba* (Gelbsenf) alle getesteten *Brassica* Genotypen Amplifikationsplots zeigten. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte resultierte in einer 108 bp großen Bande bei Raps, zwei Banden von 108 bp und ca. 150 bp bei Rüben und einer ca. 150 bp großen Bande bei Ölrettich.

In Abbildung 3-3 sind die Amplifikationsplots einer Raps DNA-Verdünnungsreihe, Sorte 'Modul', mit dem Real-Time PCR Assay des *pepc3*-Gen und einer Primerkonzentration von je 300 nM zu sehen. Die Amplifikationsplots erreichten bei dem *pepc3* Assay mit abnehmender Konzentration der Verdünnungsstufen ein immer niedrigeres Endniveau an Amplifikat und die Kurvenverläufe waren zackig. Die Steigung der Regressionsgeraden liegt mit -3,91 weit unter dem Idealwert von -3,32 bei zehnfach Verdünnungen. Daraus ergibt sich eine niedrige Effizienz von 80,2%. Der Korrelationskoeffizient von 99,7% ($R^2 = 0,997$) zeigt jedoch immer noch eine gute Anpassung der Messwerte an die lineare Regression.

PCR Assay für das S-Glucosyltransferase-Gen

Das Enzym UDP-Glucose:thiohydroximate S-Glucosyltransferase (S-GT) ist am letzten Schritt der Synthese von Glucosinolat beteiligt. Das S-GT-Gen (*s_{gt}*) hat einige Isoformen. Für den qualitativen *s_{gt}*-PCR Assay wurde die Sequenz 34 (WO9716559/ EMBL A62529) genutzt. Eine Spezifitätsprüfung des *s_{gt}*-Gen Referenz PCR Assays gegenüber Raps erfolgte durch eine qualitative PCR mit verschiedenen landwirtschaftlichen Kulturarten und Rapsorten. Kulturarten, die nicht zu den *Brassicaceae* gehören, sowie die entfernte Verwandte *Arabidopsis thaliana* konnten nicht mit dem *s_{gt}*-PCR Assay detektiert werden (Abbildung 3-4/A). Für alle getesteten Sommer- und Winterrapsorten war der Assay hingegen sensitiv (Abbildung 3-4/B). Nahe Verwandte von *B. napus* wie *B. rapa* (Rübsen, Herbstrübe), *B. oleracea* (Markstammkohl, Kohlrabi, Rosenkohl), *Sinapsis alba* (Gelbsenf) und *Raphanus sativus oleiferus* (Ölrettich) produzierten ebenfalls PCR-Fragmente von 614 bp Nukleotidlänge. Somit darf der *s_{gt}*-PCR Assay nicht als Spezies spezifisch angesehen werden, sondern als spezifisch für die Gattung *Brassica*.

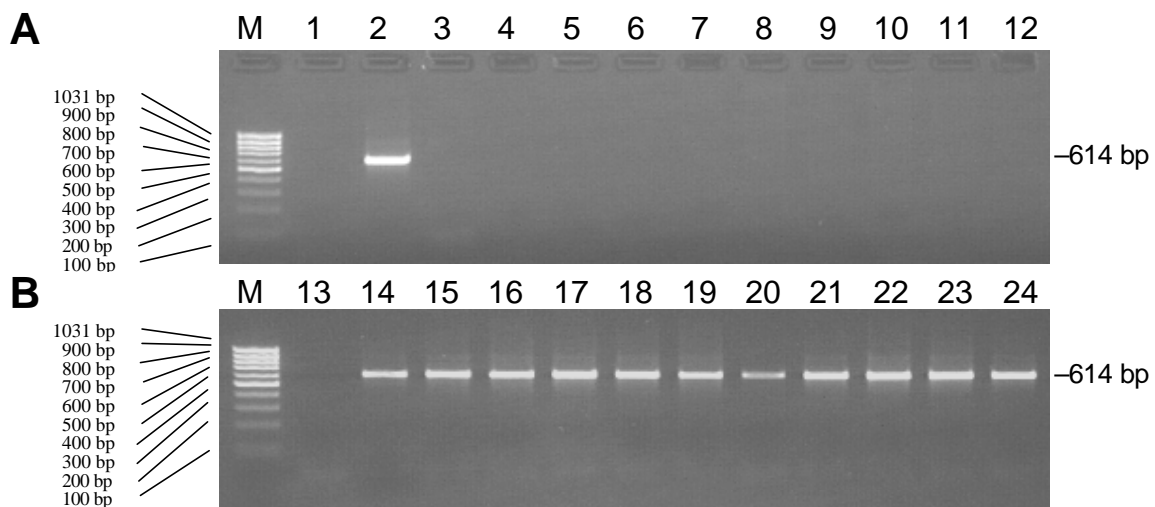


Abbildung 3-4: Die Spezifität des qualitativen *s_{gt}*-Gen Referenz PCR Assays

A: (M) 100 bp Leiter, (1) H₂O, (2) *B. napus* (Positivkontrolle), (3) *Arabidopsis thaliana*, (4) *Glycine max*, (5) *Solanum tuberosum*, (6) *Beta vulgaris*, (7) *Zea mays*, (8) *Triticum spelta*, (9) *Avena sativa*, (10) *Secale cereale*, (11) *Triticum aestivum* (Sommerweizen), (12) *Triticum aestivum* (Winterweizen).

B: (M) 100 bp Leiter, (13) H₂O, (14-19) verschiedene Winterrapsorten, (20-24) verschiedene Sommerrapsorten.

Um zu überprüfen, ob die Gene in ausreichend niedriger Kopienzahl vorliegen, erfolgte auch für die *s_{gt}*-Sequenz eine RFLP-Analyse. Die geschnittene, genomische DNA der Sorten 'Falcon', 'Artus', 'Modul' und 'Avalon' wurde mit radioaktiv markierten PCR-Produkten hybridisiert, die mit dem Primerpaar *s_{gt}-f/ s_{gt}-r* aus DNA der LL-Sorte 'Modul' amplifiziert

worden waren. Es konnten zwei (*HindIII*), drei (*BamHI*, *XbaI*), vier (*EcoRV*) bzw. sechs (*EcoRI*) diskrete Banden detektiert werden (Abbildung 3-5). Die Banden waren bei allen Rapsorten identisch.

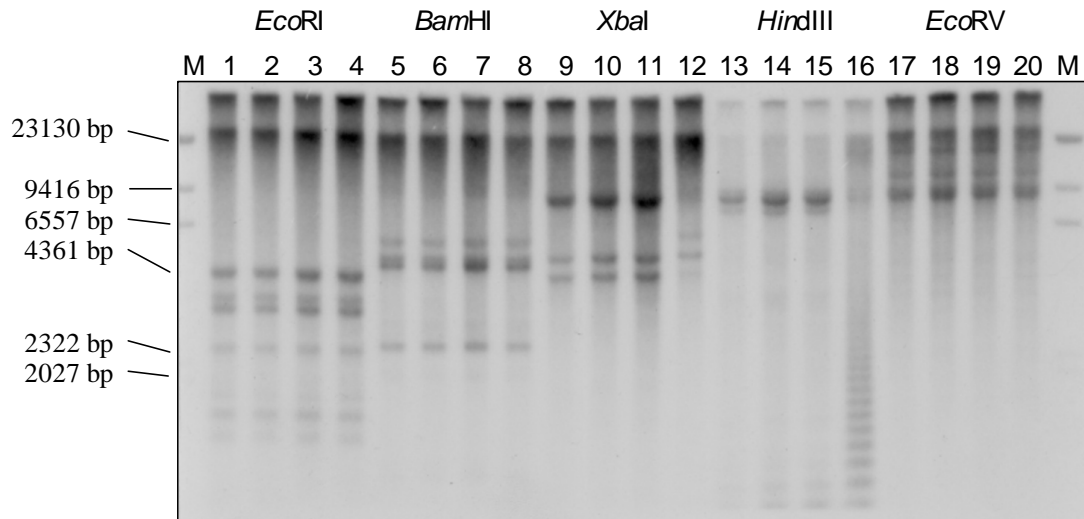


Abbildung 3-5: RFLP-Analyse genomischer Raps-DNA mit einer *s_gt*-Gen spezifischen Sonde (1, 5, 9, 13, 17) 'Modul', (2, 6, 10, 14, 18) 'Falcon', (3, 7, 11, 15, 19) 'Avalon', (4, 8, 12, 16, 20) 'Artus'; (M) Längenstandard λ *Hind III*.

Nur bei Sorte 'Artus' (*XbaI*, *HindIII*, Spur 16) ergaben sich leichte Abweichungen im Hybridisierungsmuster. Da diese aber bei der Hybridisierung mit allen RFLP-Sonden auftraten, sind sie wahrscheinlich das Produkt einer partiellen Restriktion. Durch das 'Southern Blotting' konnte nachgewiesen werden, dass die *s_gt*-Sequenz ein 'low copy' Gen ist. Die exakte Angabe der Kopienzahl ist wegen möglicher homologer Sequenzen auf dem A- und/ oder C-Genom nicht möglich.

Real-Time PCR Assay für das S-Glucosyltransferase-Gen

Die Entwicklung des quantitativen Real-Time PCR Assays *s_gt*-TM, beruhend auf dem S-Glucosyltransferase-Gen, erfolgte innerhalb von Sequenz 34 (WO9716559/ EMBL A62529).



Abbildung 3-6: Positionierung von Primern und Sonde des Real Time *s_gt*-TM-Referenz PCR Assays Oligonukleotide des Real-Time PCR Assays für das S-Glucosyltransferase-Gen (*s_gt*-TM) sind fett markiert, der Sondenbereich ist hell-grau hinterlegt.

Das *s_{gt}*-TM-Primer/ Sonde-System wurde als Referenz Assay für alle weiteren Real Time PCR-Analysen gewählt. Die Lage der *s_{gt}*-TM-Sonde und Primer zeigt Abbildung 3-6. Anschließend wurde eine Evaluierung der Spezifität dieses Real-Time PCR Assays gegenüber *B. napus*, *B. rapa*, *Raphanus sativus oleiferus* und *Sinapsis alba* durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass alle Genotypen deutliche PCR-Amplifikationsplots zeigten. Damit ist der quantitative Real-Time PCR Assay für das *s_{gt}*-Gen entsprechend dem qualitativen ebenfalls nicht spezifisch für Raps, sondern für nahe Rapsverwandte der *Brassicaceae*. Die Evaluierung verschiedener Konzentrationskombinationen des *s_{gt}*-TM-Vorwärts- und Rückwärtsprimers mittels Primermatrix ergab für beide eine optimale Konzentration von 300 nM.

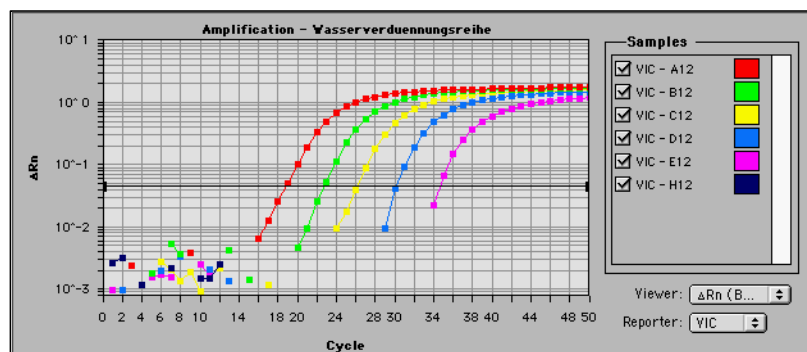


Abbildung 3-7: Amplifikationsplots zur Kalibrierung des Real Time *s_{gt}*-TM-Referenz PCR Assays DNA-Verdünnungsstufen der LL-Rapssorte 'Modul': (A12) 26 531 Kopien, (B12) 2 653 Kopien, (C12) 265 Kopien, (D12) 27 Kopien, (E12) 2,7 Kopien, (H12) H₂O; Kalibrierfunktion: $y = 40,3 - 3,89x$; $R^2 = 0,998$

In Abbildung 3-7 sind die Amplifikationsplots einer genomischen DNA-Verdünnungsreihe der LL-Rapssorte 'Modul' zu sehen. Dazu wurde der Real-Time PCR Assay *s_{gt}*-TM mit einer Primerkonzentration von je 300 nM durchgeführt. Die Fluoreszenzkurven der Verdünnungsstufen des *s_{gt}*-TM PCR Assays zeigen stetige, parallele Verläufe (Abbildung 3-7: A12-E12), die auch bei abnehmender Kopienzahl ein etwa gleich hohes Niveau erreichen (vgl. Abbildung 3-7, Plateau bei Ct 50). Die Steigung der Regressionsgeraden lag mit -3,89 unter dem Idealwert von 3,32 für zehnfach Verdünnungen, woraus sich eine geringe PCR-Effizienz von 80,7% ergab. Eine gute Anpassung der Messwerte an die lineare Regression belegt der Korrelationskoeffizient von 99,8% ($R^2 = 0,998$).

Zum Vergleich der beiden Real Time PCR-Referenz Assays waren *pepc3*-TM und *s_{gt}*-TM mit derselben Verdünnungsreihe getestet worden (vgl. Abbildungen 3-3 und 3-7). Aufgrund des stetigeren Verlaufs der Fluoreszenzkurven wurde der *s_{gt}*-TM als der effizientere und robustere Real-Time PCR Assay eingestuft.

3.1.2 Allgemeiner Nachweis transgener DNA-Sequenzen

PCR Assay für den 35S-Promotor

Die 35S-Promotorsequenz (P-35S) des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) wurde zum allgemeinen Nachweis von transgenen DNA-Sequenzen als 'Screening'-Assay ausgewählt. Er ist integraler Bestandteil des Transformationsvektors pHoe6/Ac, der zur Transformation der *pat*-transgenen Sorte 'Falcon GS40/90' ('Modul') verwendet worden war.

Für den qualitativen P-35S-Assay erfolgte die Wahl der Primer 35S-1/35S-2 nach HURST et al. (1999). Die Spezifität des P-35S Assays konnte für die LL-Linien 'T25' (Mais), 'Modul' (Raps) und 'T120-7' (Zuckerrübe) mit der qualitativen PCR gezeigt werden. Alle LL-Linien produzierten ein entsprechendes Fragment mit 195 bp (Abbildung 3-8).

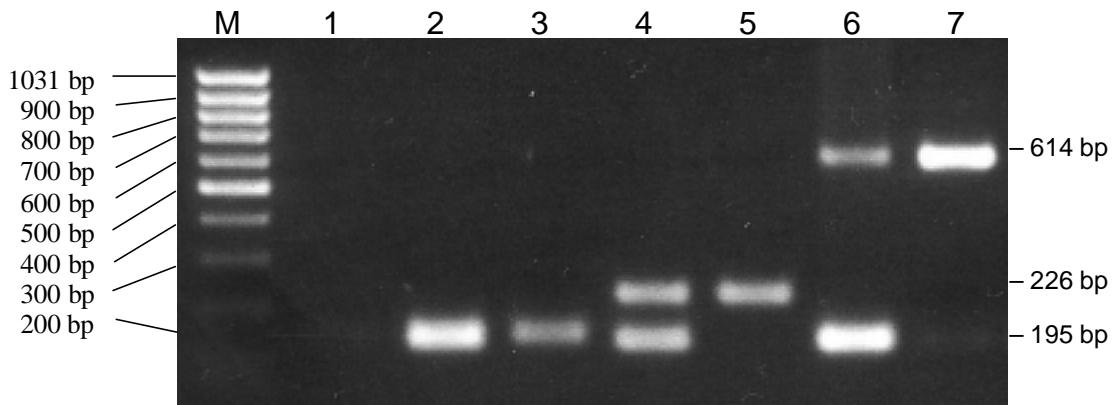


Abbildung 3-8: Die Spezifität des qualitativen P-35S Screening PCR Assays mit integrierten Referenz PCR Assays
 (M) 100 bp DNA-Leiter, (1) H₂O, (2) LL-Zuckerrübe 'T120-7', (3) nicht-transgene Zuckerrübensorte 'Ribella', (4) LL-Mais 'T25', (5) nicht-transgene Maissorte 'Monopol', (6) LL Rapssorte 'Modul', (7) nicht-transgene Rapssorte 'Falcon'

Die PCR-Fähigkeit der DNA wurde durch die mitgeführten Spezies spezifischen PCR-Referenzsysteme belegt. Dies war für Raps das Primerpaar *s_{gt}-f/r* für ein Amplikon von 614 bp, für Mais das Primerpaar *ivr1-f/r* für ein maisspezifisches Invertasegen (EMBL: AF171874) mit 226 bp Amplikonlänge und für Zuckerrübe der Mikrosatellit *bvm1-for/rev* nach Angaben von MÖRCHEN et al. (1996) mit einer Amplikonlänge von 151 bp. Die ähnliche Amplikonlänge des 35S-1/2-Primerpaares (195 bp) und des Zuckerrüben spezifischen PCR-Referenzsystems (151 bp) verhinderte eine Auftrennung der beiden Fragmente im 2%igen Agarosegel. Dies zeigt sich auf Abbildung 3-8 mit einer einzigen, intensiven Bande für die Zuckerrübensorte 'Prestige-LL' (T120-7) in diesem Längenbereich. Auch die Maissorten Maximizer[®] (Bt176) und YieldGard[®] (MON810) mit einer transgenen Resistenz gegenüber dem Maiszünzler produzierten mit dem P-35S PCR Assay die typischen PCR-Produkte von 195 bp.

Real-Time PCR Assay für den 35S-Promotor

Die Entwicklung des Real Time Screening PCR Assays TM-35S erfolgte auf Grundlage der Sequenz der EMBL-Datenbank (EMBL A18053/ WO9209696-A/4). Zur Herstellung der PCR-Fragmente für die Klonierung dienten die spezifischen Primer 35S-1/ 35S-2. Die LL-Linien von Raps und Mais sowie die bt-Maislinien Bt176 und MON810 produzierten ausschließlich Amplikons von 195 bp Länge. Nach einer T/A-Klonierung mit Hilfe des Plasmidvektors pCR[®]4-Topo[®] wurden die Fragmente sequenziert und die DNA-Sequenz verglichen.

	10	20	30	40	50
35S EMBL: A18053	GCTCCTACAA	ATGCCATCAT	TGCGATAAAG	GAAAGGCTAT	CATTCAAGAT
LL-Raps	-----	-----	-----	-----	-----
LL-Mais	-----	-----	TGCGATAAAG	GA-AGGC C AT	C GTT C AAGAT
Bt176 Mais	-----	-----	TGCGATAAAG	GA-AGGC C AT	C GTT C AAGAT
MON810 Mais	-----	-----	-----	-----	-----AAGA-
	60	70	80	90	100
35S EMBL: A18053	GCCTCTGCCG	ACAGTGGTCC	CAAAGATGGA	CCCCACCCA	CGAGGAGCAT
LL-Raps	--CTCTGCCG	ACAGTGGTCC	CAAAGATGGA	CCCCACCCA	CGAGGAGCAT
LL-Mais	GCCTCTGCCG	ACAGTGGTCC	CAAAGATGGA	CCCCACCCA	CGAGGAGCAT
Bt176 Mais	GCCTCTGCCG	ACAGTGGTCC	CAAAGATGGA	CCCCACCCA	CGAGGAGCAT
MON810 Mais	GCCTCTGCCG	ACAGTGGTCC	CAAAGATGGA	CCCCACCCA	CGAGGAGCAT
	110	120	130	140	150
35S EMBL: A18053	CGTGGAAAAA	GAAGAC CGTTC	CAACCACGTC	TTCAAAGCAA	GTGGATTGAT
LL-Raps	CGTGGAAAAA	GAAGAC CGTTC	CAACCACGTC	TTCAAAGCAA	GTGGATTGAT
LL-Mais	CGTGGAAAAA	GAAGAC CGTTC	CAACCACGTC	TTCAAAGCAA	GTGGATTGAT
Bt176 Mais	CGTGGAAAAA	GAAGAC CGTTC	CAACCACGTC	TTCAAAGCAA	GTGGATTGAT
MON810 Mais	CGTGGAAAAA	GAAGAC CGTTC	CAACCACGTC	TTCAAAGCAA	GTGGATTGAT
	160	170	180	190	200
35S EMBL: A18053	GTGACATC TC	CACTGACGTA	AGGGATGACG	CACAATCCCA	CTATC
LL-Raps	GTGATATC TC	CACTGACGTA	AGGGATGACG	CACAATCCCA	CTATC
LL-Mais	GTGATATC TC	CACTGACGTA	AGGGATGACG	CACAATCCCA	CTATC
Bt176 Mais	GTGATATC TC	CACTGACGTA	AGGGATGACG	CACAATCCCA	CTATC
MON810 Mais	GTGATATC TC	CACTGACGTA	AGGGATGACG	CACAATCCCA	CTATC

Abbildung 3-9: Sequenzvergleich der 35S-Promotorregion transgener Raps- und Maislinien
 Darstellung des sequenzierten P-35S im Vergleich zur Sequenz des synthetischen CaMV P-35S der EMBL-Datenbank: A18053; Nukleotide, die nicht mit Datenbank-Sequenz übereinstimmen, sind weiß mit dunkelgrauer Hinterlegung dargestellt; Oligonukleotide des TM-35S-Real-Time PCR Assays sind fett hervorgehoben, der Sondenbereich ist hellgrau hinterlegt; nicht übereinstimmende Bereiche sind durch Trennstriche (-) getrennt.

Die Nukleotidsequenzen des P-35S zeigten hohe Homologien (siehe Abbildung 3-9). Im Anschlussbereich des Vorwärtsprimers waren jedoch zwischen den Bt-Maislinien Bt176 und MON810 sowie bei dem LL-Mais 'T25' einzelne Nukleotidaustausche festzustellen. Der LL-Mais 'T25' wies zusätzlich eine Motivwiederholung auf. Beim LL-Raps 'Modul' wurde eine Deletion von drei Nukleotiden in der Nähe des Vorwärtsprimers gefunden. Die Bereiche in unmittelbarer Nähe der Sequenzierprimer waren nicht eindeutig bestimmbar (Abbildung 3-9).

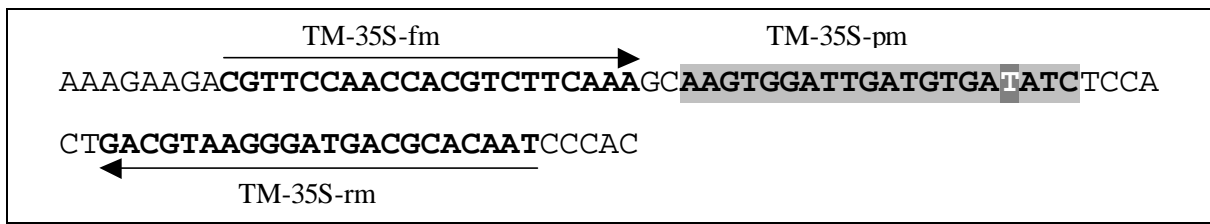


Abbildung 3-10: Positionierung von Primern und Sonde des Real Time P-35S Screening PCR Assays
 Oligonukleotide des Real Time P-35S Screening PCR Assays sind fett markiert, der Sondenbereich ist hellgrau hinterlegt und Punktmutationen sind in weißer Schrift gehalten sowie dunkelgrau hinterlegt.

Die Auswahl des Sonde/ Primer-Systems erfolgte in einem Sequenzbereich von 143 bp (Abbildung 3-9), in dem keine Sequenzunterschiede zwischen den 35S-Promotoren der sequenzierten GVP-Genotypen auftraten. Dies sollte eine breite Anwendung des Assays ermöglichen. Es wurde eine MGB-Sonde verwendet, um trotz der kurzen Sequenz die Einhaltung aller Parameter im Optimum zu garantieren. In Abbildung 3-10 ist die Lage der P-35S-Sonde (TM-35S-pm) sowie der 35S-Vorwärts- und Rückwärtsprimer (TM-35S-fm/rm) dargestellt.

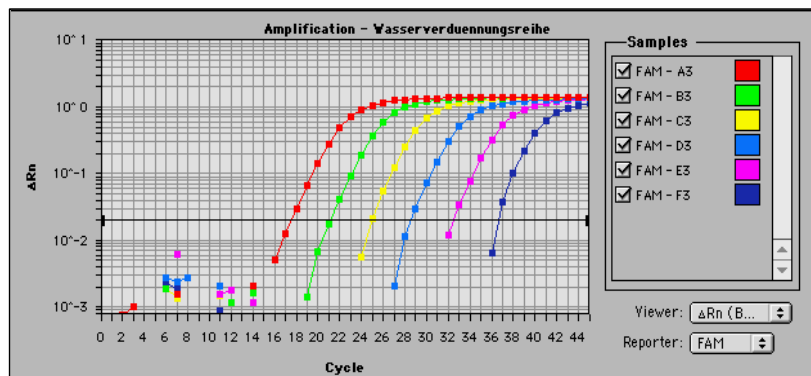


Abbildung 3-11: Amplifikationsplots zur Kalibrierung des Real Time P-35S Screening PCR Assays
 DNA-Verdünnungsstufen der LL-Rapssorte 'Modul':
 Amplifikationsplot der Verdünnungsstufen mit: 382 041 Kopien (A3), 38 204 Kopien (B3), 3 820 Kopien (C3), (D3) 382 Kopien, 39 Kopien (E3), 4 Kopien (F3), H₂O (G3); Kalibrierfunktion: $y = 37,6 - 3,32x$; $R^2 = 0,999$

Ein Optimierungsschritt mit Hilfe einer Primermatrix ergab für Vorwärts- und Rückwärtsprimer die optimale Konzentration von 300 nM. In Abbildung 3-11 sind die Amplifikationsplots einer DNA-Verdünnungsreihe der Rapssorte 'Modul' des Real-Time PCR Assays TM-35S dargestellt. Die Amplifikationskurven zeigten gleichmäßige, parallele Verläufe (Abbildung 3-11: A4-F4). Von der höchsten bis zur niedrigsten Konzentration der Zielsequenz, deren Fluoreszenzkurven die Baseline bei PCR-Zyklus 19 bzw. 39 schneiden, nahm die Konzentration jeweils 1:10 ab. Die Steigung der Regressionsgeraden entsprach mit -3,32 dem Idealwert bei zehnfach Verdünnungen ($2^{3,32} = 10$). Der Korrelationskoeffizient von 99,9% belegt die hohe Linearität des Assays im Bereich der Arbeitskonzentrationen.

3.1.3 Spezifischer Nachweis des *pat*-Transgens

PCR Assay für das *pat*-Transgen

Die *pat*-Sequenz wurde aus der EMBL-Datenbank bezogen (EMBL A99126/ EP0899340), um einen qualitativen *pat*-Gen spezifischen PCR Assay mit den Primern *pat*-f/ *pat*-r zu entwerfen. Eine Verifizierung der Spezifität des *pat*-Strukturgen PCR Assays für LL-Transgene erfolgte mit Hilfe konventioneller Sorten und LL-Linien von Mais, Raps und Zuckerrübe.

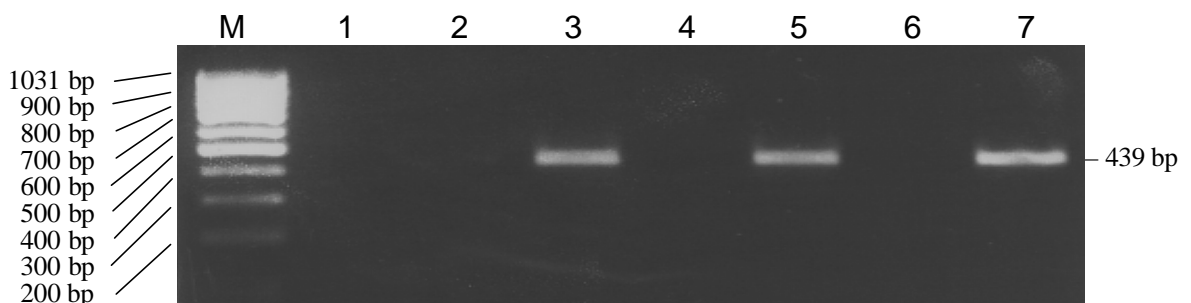


Abbildung 3-12: Die Spezifität des qualitativen *pat*-Strukturgen PCR Assays (M) 100 bp DNA-Leiter; (1) H₂O, (2) anonyme, nicht-transgene Zuckerrüben sorte, (3) LL-Zuckerrübe 'T120-7', (4) nicht-transgene Rapssorte 'Falcon', (5) LL Raps 'Modul', (6) nicht-transgene Maissorte, (7) LL-Mais 'T25'.

Wie das Gelbild von Abbildung 3-12 zeigt, trat nur bei den LL-Linien von Mais, Zuckerrübe und Raps das spezifische Amplikon von 439 bp auf. Die mitgeführte Wasserprobe belegt, die Kontaminationsfreiheit des PCR-Ansatzes. Die Kopienzahl der *pat*-Genkassette in den LL-Sorten 'Modul' und 'Avalon' wurde mit Hilfe einer RFLP-Analyse überprüft. Die genomischen Blots wurden mit *pat*-Gen spezifischen DNA-Sonden hybridisiert (Abbildung 3-13).

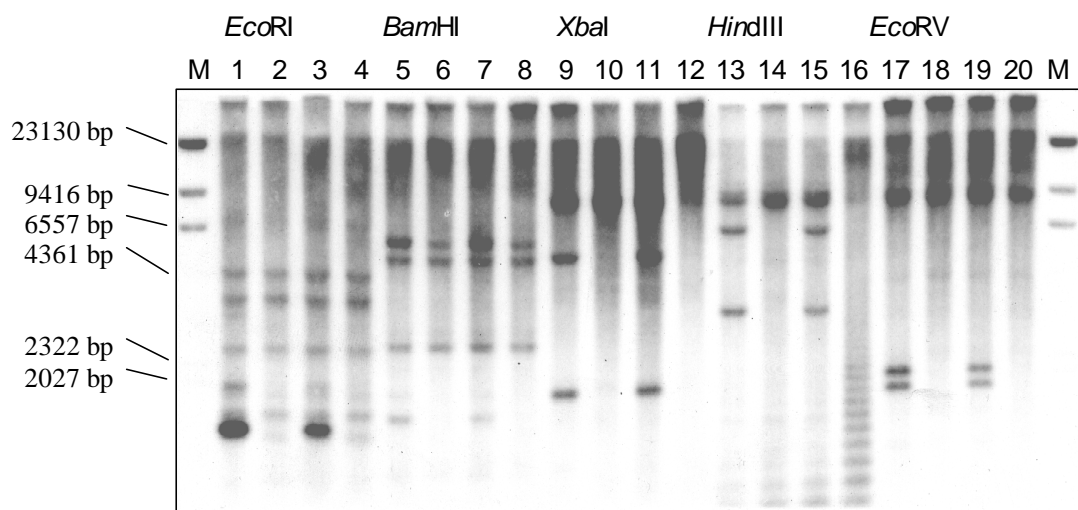


Abbildung 3-13: RFLP-Analyse genomischer Raps-DNA mit einer *pat*-Gen spezifischen Sonde (1, 5, 9, 13, 17) 'Modul', (2, 6, 10, 14, 18) 'Falcon', (3, 7, 11, 15, 19) 'Avalon', (4, 8, 12, 16, 20) 'Artus'; (MS) Längenstandard λ *Hind* III.

Bei den LL-Sorten 'Modul' und 'Avalon' zeigten sich ausschließlich ein (*Eco*RI: Spur 1, 3; *Bam*HI: Spur 5, 6) bzw. zwei Signale (*Eco*RV: Spur 17, 19; *Hind*III: Spur 13, 15; *Xba*I: Spur 9, 11; Abbildung 3-13), womit sich die angegebene Doppelinsertion pro Genomäquivalent bestätigte. Die zusätzlichen Signale, die auch bei den nicht-transgenen Sorten 'Falcon' und 'Artus' zu sehen sind, gingen demnach auf unspezifische Bindungen zurück.

3.1.4 Spezifischer Nachweis des LibertyLink® Konstruktes

PCR Assay für das LL-Konstrukt

Konstrukt spezifische PCR Assays weisen die Übergangsregion zwischen zwei funktionalen Sequenzbereichen eines transgenen DNA-Konstruktes nach. Üblicherweise wird dazu ein Primer in eine regulatorische Sequenz wie den Promotor oder Terminator und der andere in das transgene Strukturgen platziert. So erfolgt eine Beschränkung der Spezifität des Assays auf alle Konstrukte, die diese DNA-Motive mit derselben Sequenzabfolge besitzen.

	10	20	30	40	50
35S EMBL: A18053	GGATGACGCA	CAATCCCAC	ATCCTTCGCA	AGACCCTTCC	TCTATATAAG
LL-Raps	GGATGACGCA	CAATCCCAC	ATCCTTCGCA	AGACCCTTCC	TCTATATAAG
LL-Zuckerrübe	GGATGACGCA	CAATCCCAC	ATCCTTCGCA	AGACCCTTCC	TCTATATAAG
LL-Mais	GGATGACGCA	CAATCCCAC	ATCCTTCGCA	AGACCCTTCC	TCTATATAAG
	60	70	80	90	100
35S EMBL: A18053	GAAGTTCATT	TCATTTGGAG	AGGACACGCT	GAAATCACCA	GTCTCTCTCT
LL-Raps	GAAGTTCATT	TCATTTGGAG	AGGACA GGC -	-----	-----
LL-Zuckerrübe	GAAGTTCATT	TCATTTGGAG	AGGACA GGC -	-----	-----
LL-Mais	GAAGTTCATT	TCATTTGGAG	AGGACA GGC -	-----	-----
	110	120	130	140	150
35S/ pat -Junction	ATAAATCTAT	CTCTCTCTCT	ATAACC----	-----	-GTCGACATG
LL-Raps	-----	-----	-TA-CCCGGG	GATCCTCTAG	AGTCGACATG
LL-Zuckerrübe	-----	-----	-TA-CCCGGG	GATCCTCTAG	AGTCGACATG
LL-Mais	-----	-----	-TA-CCCGGG	GATCCTCTAG	AGTCGACATG
	160	170	180	190	200
pat EMBL: A99126	TCTCCGGAGA	GGAGACCAGT	TGAGATTAGG	CCAGCTACAG	CA
LL-Raps	TCTCCGGAGA	GGAGACCAGT	TGAGATTAGG	CCAGCTACAG	CA
LL-Zuckerrübe	TCTCCGGAGA	GGAGACCAGT	TGAGATTAGG	CCAGCTACAG	CA
LL-Mais	TCTCCGGAGA	GGAGACCAGT	TGAGATTAGG	CCAGCTACAG	CA

Abbildung 3-14: Sequenzvergleich der P-35S/*pat*-Übergangsregion transgener LibertyLink®-Linien Darstellung der Sequenz im Vergleich zu den EMBL-Datenbankeinträgen für den 35S-Promotor (A18053) und das *pat*-Gen (A99126); Oligonukleotide des *pat*-TM-Real-Time PCR Assays für das LL-Konstrukt sind fett hervorgehoben, der Sondenbereich ist hellgrau und die erste Base des *pat*-Gens in der Übergangsregion ist weiß hinterlegt. Bereiche die sich nicht abdecken, sind getrennt durch Trennstriche (-).

Da bekannt war, dass der Transformationsvektor pHoe6/Ac von 'Falcon GS40/90' die kodierende Sequenz eines synthetischen *pat*-Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors besitzt, erfolgte die Erstellung eines Konstrukt spezifischen PCR Assays für LL-Raps durch eine Kombination der Primer 35S-1 und *pat*-r. Anschließend diente die Primerkombination einem Spezifitätstest zur PCR-Amplifikation konventioneller und LL-Sorten von Mais, Raps sowie Zuckerrübe. Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte zeigte sich nur bei den LL-Sorten das typische PCR-Produkt von 321 bp Länge. Bei den konventionellen Sorten waren hingegen erwartungsgemäß keine Amplifikationsprodukte sichtbar.

Die spezifischen PCR-Fragmente von 321 bp aus LL-Raps, LL-Mais und LL-Zuckerrübe wurden in den Vector pCR[®]4-Topo[®] kloniert. Nach der Sequenzierung erfolgte ein Vergleich der Nukleotidabfolgen (Abbildung 3-14). Alle Sequenzen waren statt der erwarteten 279 bp nur 251 bp lang und zeigten starke Abweichungen im Bereich der theoretischen Übergangsregion von den Sequenzen der EMBL-Datenbankeinträge des 35S-Promotors (A18053) und des *pat*-Gens (A99126). Ein zusammenhängender Bereich von 62 bp Länge innerhalb des 35S-Promotors ließ sich nicht abgleichen.

Real-Time PCR Assay für das LL-Konstrukt

Zur Entwicklung des *pat*-TM-Primer/ Sonde-Systems des quantitativen LL-Konstrukt PCR Assays wurde die revers komplementäre Sequenz eingesetzt, da diese durch ihren niedrigeren G-Gehalt besser geeignet war. Die resultierende Sequenz ist zur Verdeutlichung der Lage von *pat*-TM-Sonde und -Primern in Abbildung 3-15 dargestellt.

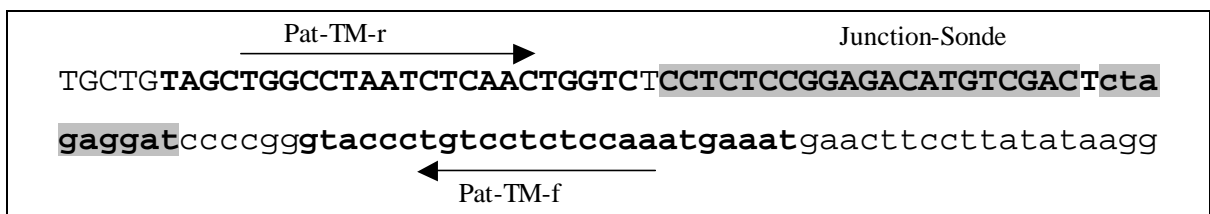


Abbildung 3-15: Position von Primern und Sonde des Real Time LL-Konstrukt PCR Assays
 Oligonukleotide des Real-Time PCR Assays für das LL-Konstrukt Gen (*pat*-TM) sind fett markiert, der Sondenbereich ist hellgrau hinterlegt; der Sequenzbereich des *pat*-Gens ist groß, der des 35S-Promotors klein geschrieben; das erste Nukleotid des *pat*-Gens (Übergangsregion) innerhalb der Sonde ist weiß hinterlegt.

Die Verifizierung der Spezifität des Real-Time PCR Assays erfolgte mit den LL-Linien 'T25' (Mais), 'Modul' (Raps) und 'T120-7' (Zuckerrübe), sowie mit den entsprechend konventionellen Sorten 'Monopol', 'Falcon', und 'Ribella'. Da nur LL-Genotypen Amplifikationsplots er-

zeugten, wurde die Spezifität des LL-Konstrukt Assays für *pat*-Transgene belegt. Die Primermatrix ergab eine optimale Konzentration von 300 nM für Vorwärts- und Rückwärtsprimer. In Abbildung 3-16 sind die Amplifikationsplots einer DNA-Verdünnungsreihe der Rapssorte 'Modul' mit dem quantitativen LL-Konstrukt PCR Assay und der Primerkonzentration (*pat*-TM-f/r) von 300 nM zu sehen. Die Amplifikationsplots zeigten gleichmäßig steile und parallele Kurvenverläufe für alle Konzentrationsstufen und erreichten bei Ct 45 ein gleich hohes Endniveau (Abbildung 3-16/ A1-F1). Das Fehlen einer Fluoreszenzkurve der Nullprobe (Abbildung 3-6/ / A3) belegt, dass der PCR-Ansatz keine DNA-Kontaminationen enthielt.

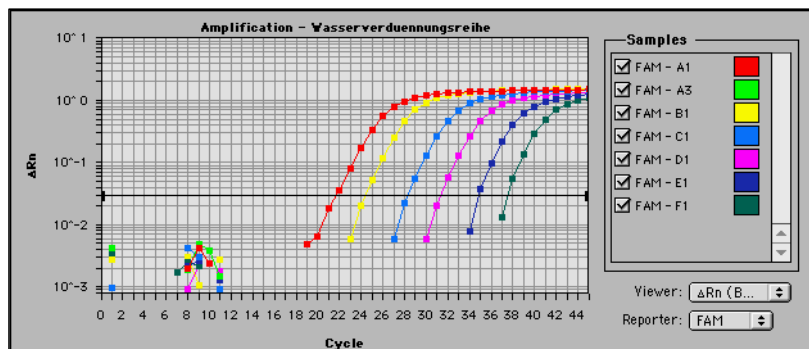


Abbildung 3-16: Amplifikationsplots zur Kalibrierung des Real Time LL-Konstrukt PCR Assays
 DNA-Verdünnungsstufen der LL-Rapssorte 'Modul': (A1) 254 670 Kopien, (B1) 25 467 Kopien, (C1) 2547 Kopien, (D1) 255 Kopien, (E1) 26 Kopien, (F1) 2,6 Kopien, (A3) H₂O; Kalibrierfunktion: $y = 42,7 - 3,23 x$; $R^2 = 0,998$

Die Steigung der Regressionsgeraden von -3,23 war etwas höher als der Idealwert von zehnfach Verdünnungen (-3,32). Daraus ergab sich die hohe Effizienz von 100,4%, die den Maximalwert 100% leicht übersteigt. Der Korrelationskoeffizient von 99,8% ($R^2 = 0,998$) zeigt eine gute Anpassung der Messwerte an die Regressionsgerade.

3.2 Validierung der molekularen Nachweissysteme für LibertyLink® Raps

Zur Validierung der erstellten PCR Assays erfolgte eine Entwicklung und ein Vergleich verschiedener Kalibrierstandards (vgl. S.37, Material und Methoden). Durch serielle Wasserverdünnung wurden hergestellt: 'Verdünnte genomische' (VG)-Standards aus LL-Raps-DNA und 'verdünnte plasmidale' (VP)-Standards aus LL-Konstrukt-Plasmiden. Zu den gemischten Standards, die eine Mischung konventioneller mit LL-Raps-DNA enthalten, gehören folgende Standards: Die 'gemischten Samen' (MS)-Standards entstanden durch Mischung auf Saatgutebene, die 'gemischten genomischen' (MG)-Standards entstanden durch Mischung auf DNA-Ebene und die 'gemischten plasmidalen und genomischen' (MPG)-Standards entstanden durch Mischung von LL-Konstrukt Plasmiden mit konventioneller Raps-DNA

Für die plasmidalen Standards dienten linearisierte pCR®4-TOPO®-Plasmide (Invitrogen, D-Karlsruhe). Zum Einen wurden Plasmide kloniert, die lediglich die 321 bp lange Übergangsregion der Nukleotidsequenz von 35S-Promotor und dem *pat*-Gen trugen, zum Anderen Plasmide, die neben dieser Übergangsregion auch ein 614 bp Fragment des *Brassica* spezifischen *s_gt*-Referenzgens besaßen. Mit Hilfe der *PmeI*-Restriktionsstelle, die 16 bp von der TA-Klonierungsstelle entfernt war, erfolgte die Herstellung plasmidaler Mengenstandards mit Doppelinsertion. Für die Plasmidlinearisierung wurde die resultierende Sequenz aus Insert- und Plasmidsequenz (<http://www.invitrogen.com>) mit Primer Premier 4.04 (Primer Biosoft International, USA-Palo Alto) auf Restriktionsschnittstellen untersucht. Die Wahl fiel auf das Enzym *ScaI*, dessen Schnittstelle ca. 2000 bp in beide Richtungen von der TA-Klonierungsstelle entfernt ist und das genau einmal außerhalb des Inserts schneidet. Damit sollte eine möglichst geringe Beeinträchtigung der PCR-Fähigkeit im Falle eines enzymatischen Abbaus durch Exonukleasen gewährleistet werden.

Unter Berücksichtigung der integrierten Kopienzahl des LL-Konstrukts erfolgte die Umrechnung der eingesetzten DNA-Menge der jeweiligen Verdünnungsstufe in Genkopienzahlen pro haploidem Genom. Die berechneten Kopienzahlen dienten als Grundlage für die Kalkulation von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NG, BG). Dabei kennzeichnet die NG die kleinste nachweisbare und die BG die kleinste quantifizierbare Genkopienzahl (vgl. S. 42, Material und Methoden). Da die qualitative PCR nicht der Quantifizierung dient, wurden außer der NG keine Validierungsparameter erhoben. Werden im Folgenden Kopien mit Kommastellen angegeben, so ist die aufgrund der Verdünnung oder Vermischung der Standards errechnete durchschnittliche Kopienzahl gemeint.

3.2.1 Qualitative PCR-Nachweissysteme

Die Schätzung der NG erfolgte für die qualitativen PCR Systeme durch eine PCR-Amplifikation genomischer Kalibrierstandards. In der qualitativen PCR ist die NG durch die Verdünnungsstufe gekennzeichnet, die gerade noch eine sichtbare Bande auf dem Agarosegel zeigt. Durch die Dokumentation der elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte und deren visuelle Auswertung ist nur eine ungefähre Schätzung der NG möglich. Für die Referenzsysteme wurde keine Schätzung der NG mit qualitativen PCR Systemen vorgenommen, da dies in praktischen Fragestellungen keine Relevanz hat.

PCR Assay zum Nachweis des 35S-Promotors

Zur Bestimmung der NG des qualitativen P-35S Screening PCR Assays wurden VG-Standards der LL-Rapssorte 'Modul' mit den Primern 35S-1/ 35S-2 amplifiziert. Die Verdünnung der VG-Standards erfolgte stufenweise mit Wasser, bis die Verdünnungsreihe einen Bereich von 106 000 Kopien (65 000 pg) bis 0,01 Kopie (0,006 pg) umfasste. Als Negativkontrolle wurde DNA der nicht-transgenen Sorten 'Falcon' und 'Artus' sowie eine Wasserkontrolle mitgeführt, die auf dem Gelbild keine Signale zeigten (Abbildung 3-17). Die NG des P-35S Screening PCR Assays lag in einem Intervall von 1-11 Kopien (0,06 - 0,6 pg).

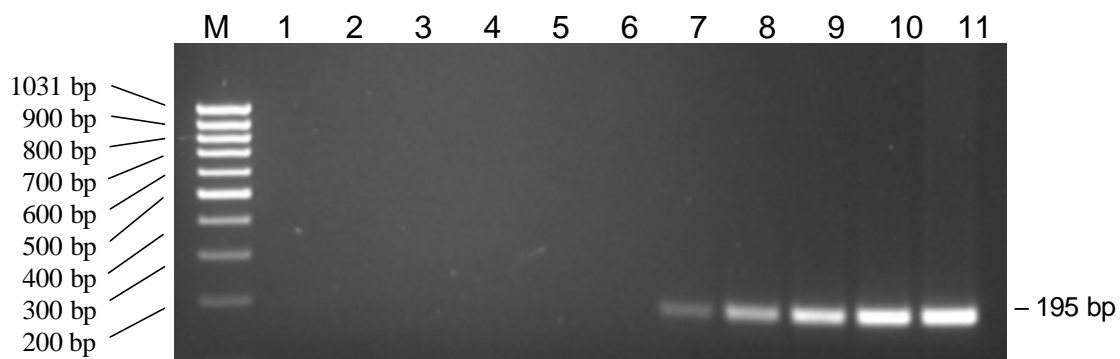


Abbildung 3-17: Evaluierung der Nachweisgrenze des qualitativen P-35S Screening PCR Assays (M) 100 bp DNA-Leiter, (1) H₂O, konventionelle Rapssorten (2) 'Falcon' und (3) 'Artus'; LL-Kalibrationsstandards aus der LL-Rapssorte 'Modul': (4) 0,01 Kopie, (5) 0,1 Kopie, (6) 1 Kopie, (7) 11 Kopien, (8) 106 Kopien, (9) 1 060 Kopien, (10) 10 600 Kopien, (11) 106 000 Kopien.

PCR Assay zum Nachweis des *pat*-Transgens

Für die Evaluierung der NG des PCR Assays zum Nachweis des *pat*-Transgens wurden MG-Standards verwendet, hergestellt aus DNA der LL-Rapssorte 'Modul' durch serielle Mischung mit nicht-transgener DNA der Ausgangslinie 'Falcon'. Der Messbereich umfasste 2 Kopien (1,225 pg) bis 20 000 Kopien (12 250 pg) des *pat*-Gens. Die PCR-Fähigkeit der DNA belegte

das mitgeführte Spezies spezifische PCR-Referenzsystem für die S_{GT}. Bei allen Verdünnungsstufen des *pat*-Gens (Abbildung 3-18, oberer Kamm) war das PCR-Fragment des *s_{gt}*-PCR Assays von 614 bp in gleicher Intensität sichtbar, was auf etwa gleich hohe DNA-Mengen in allen Verdünnungsstufen deutet.

Die Amplifikation der MG-Standards mit Hilfe des qualitativen *pat*-Strukturgen PCR Assays (Primer *pat-f/ pat-r*) resultierte in PCR-Fragmenten der erwarteten Länge von 439 bp mit abgestufter Bandenintensität entsprechend des abnehmenden *pat*-Gen Gehaltes (Abbildung 3-18: unterer Kamm). Die NG des *pat*-Strukturgen PCR Assays lag mit den MG-Standards im Intervall von 20 - 100 Kopien (12,3 - 61,3 pg), da bei 100 Kopien die PCR-Bande auf dem Gelbild noch erkennbar ist, bei 20 Kopien dagegen nicht mehr (vgl. Spur 6 bzw. 5 in Abbildung 3-18). Die Wasserprobe (Spur 1) als Negativkontrolle des *s_{gt}*-Referenz PCR Assays und die für den *pat*-Strukturgen PCR Assay als Negativkontrolle fungierende DNA der konventionellen Rapssorte 'Falcon' (Spur 2), zeigten bei diesem PCR Assays keine Signale. Es lag also keine DNA-Kontaminationen vor. Die NG des *pat*-Strukturgen PCR Assay befand sich unter Einsatz von VG-Standards, mit einem Arbeitsbereich von 16 300 – 0,2 Kopien (10 000-0,1 pg), in einem Intervall von 16 - 163 *pat*-Gen Kopien.

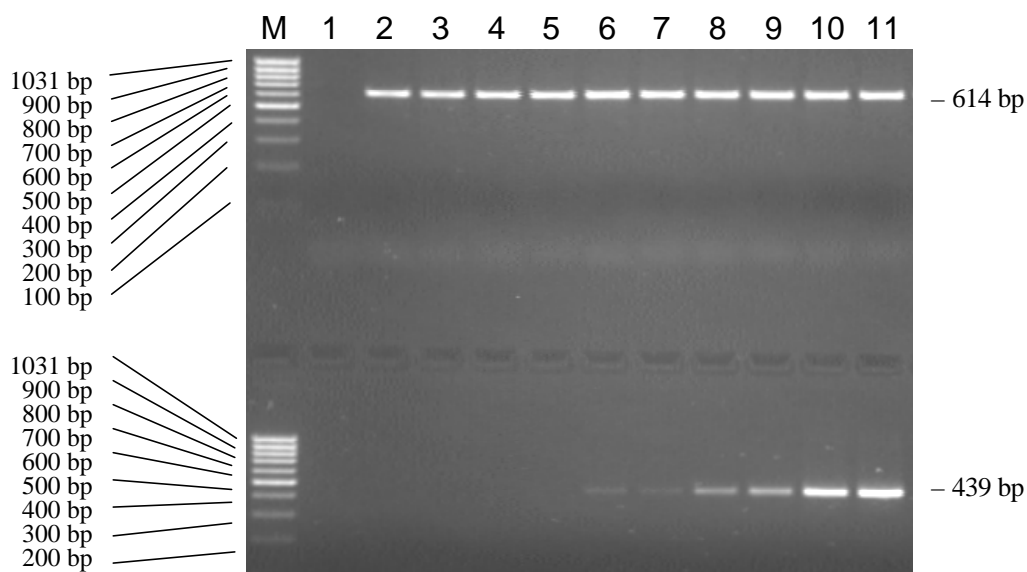


Abbildung 3-18: Evaluierung der Nachweisgrenze des qualitativen *pat*-Transgen PCR Assays (M) 100 bp DNA-Leiter, (1) H₂O, (2) nicht-transgene Rapssorte 'Falcon', MG-Standards mit *pat*-Gen Kopien: (3) 2 Kopien, (4) 10 Kopien, (5) 20 Kopien, (6) 100 Kopien, (7) 200 Kopien, (8) 1 000 Kopien, (9) 2 000 Kopien, (10) 10 000 Kopien, (11) 20 000 Kopien.

3.2.2 Quantitative Real Time PCR-Nachweissysteme

Die Erhebung der Validierungsparameter für die quantitativen Real Time PCR-Nachweissysteme erfolgte mit verschiedenen DNA-Kalibrierstandards. Zu diesem Zweck wurden der quantitative LL-Konstrukt bzw. der *s_{gt}*-Referenz PCR Assay in Monoplex-Reaktionen parallel auf der ABI 7700 Plattform eingesetzt. Die Regressionsparameter der Kalibrierstandards sind in Tabelle 3-1 zusammengestellt. Für die mit Wasser verdünnten Standards erfolgte die Angabe aller Parameter des LL-Konstrukt (Reihe *Ct_{pat}*) und des Referenz PCR Assays (Reihe *Ct_{s_{gt}}*). Durch die gleichbleibende Kopienzahl des *s_{gt}*-Referenzgens der gemischten Standards ist die Bildung einer Regression über die *s_{gt}*-Gen Kopien unmöglich. Um das Referenzsystem mit einzubeziehen, musste die ΔCt -Methode angewandt werden. Durch Subtraktion der *Ct_{s_{gt}}* Mittelwerte von den *Ct_{pat}* Einzelwerten erfolgte die Ableitung der ΔCt Werte, die gemeinsam mit den Logarithmen der Kopien zur Berechnung der Regression dienen (vgl. Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Regressionsparameter verschiedener Real-Time PCR Kalibrierstandards

Kalibrierstandards	Ct	Achsenabschnitt	Steigung	R ²	Effizienz
VG	<i>Ct_{pat}</i>	40,07	-3,35	0,9910	0,99
	<i>Ct_{s_{gt}}</i>	39,33	-3,38	0,9915	0,97
VP	<i>Ct_{pat}</i>	40,51	-3,65	0,9955	0,88
	<i>Ct_{s_{gt}}</i>	39,57	-3,57	0,9864	0,91
MS	<i>Ct_{pat}</i>	40,10	-3,37	0,9895	0,98
	ΔCt	20,29	-3,38	0,9810	0,98
MG	<i>Ct_{pat}</i>	39,78	-3,26	0,9966	1,02
	ΔCt	19,22	-3,21	0,9975	1,05
MPG	<i>Ct_{pat}</i>	40,63	-3,42	0,9961	0,96
	ΔCt	19,30	-3,35	0,9952	0,99
VG _{35S}	<i>Ct_{35S}</i>	39,35	-3,23	0,9979	1,04
	<i>Ct_{s_{gt}}</i>	39,46	-3,38	0,9994	0,98

$\Delta Ct = Ct_{pat} - Ct_{s_{gt}}$; Standards: VG = 'verdünnte genomische' DNA, VP = 'verdünnte plasmidale DNA', MS = 'gemischte Samen', MG = 'gemischte genomische DNA', MPG = 'gemischte plasmidale & genomische' DNA; der VG-Standard des LL-Assays und der VG_{35S}-Standard des P-35S Assays unterscheiden sich in der Kopienzahl der Kalibrierstufen.

Alle Standards zeigten eine gute Anpassung an das lineare Regressionsmodell mit Korrelationskoeffizienten von 99%, mit Ausnahme der ΔCt -Regression des MS-Standards mit nur 98,10%. Effizienzen über 100% können durch die Anpassung einer linearen Regression ent-

stehen, geringere Effizienzen sind meist die Folge einer PCR-Hemmung. Die VG-, MS-, MG- und VG_{35S}-Standards hatten hohe Effizienzen zwischen 97% und 102%. Effizienzen unter 95% bzw. über 105% zeigten lediglich die VP-Standards mit 88% für die LL-Regression und 91% für die *s_{gt}* Regression, bzw. der MG-Standard mit 1,05 für die Δ Ct Regression. Die Effizienzen der LL- und *s_{gt}*-Regression der 'verdünnten Standards' bzw. der LL- und Δ Ct Regression der 'gemischten Standards' unterschieden sich um weniger als 0,03. Dagegen zeigten die Regressionen der P-35S Screening und *s_{gt}* Referenz Assays Differenzen von 0,06.

Für die verdünnten Standards wurde ein F-Test auf Homogenität der Varianzen von gemessenen LL- und *s_{gt}*-Kopien sowie ein T-Test zum Vergleich der Erwartungswerte vorgenommen. Nur bei Gleichheit der Varianzen und Erwartungswerte liegt das gleiche Verteilungsmodell vor, das es erlaubt, errechnete *s_{gt}*-Gen und LL-Konstrukt Kopien (bzw. P-35S) zueinander in Beziehung zu setzen. Die Nullhypothese auf Gleichheit der Varianzen konnte auf keiner Stufe dieser Standards widerlegt werden. Lediglich bei der obersten Stufe der VP-Standards überstieg der Prüf- den Tabellenwert (Tabelle 3-2 bis 3-4). Bei VG-Standards konnte die Tendenz beobachtet werden, dass sich sowohl die Erwartungswerte als auch die Varianzen der *s_{gt}*- und LL-Kopien in keiner oder maximal einer von sechs Stufen unterschieden.

Schätzung der Bestimmungs- und Nachweisgrenzen über Vertrauensintervalle

Die Breite des relativen Vertrauensintervalls (rel. VI) für die geschätzte Kopienzahl, innerhalb dessen die 'tatsächliche' Kopienzahl liegt, ist ein Maß für die Präzision der PCR-Methode. Das rel. VI (95%) bezeichnet den Bereich, in dem mindestens 95% der Messpunkte innerhalb der erwarteten Grenze liegen. Im Folgenden wird bei der Erwähnung des VI immer von einem 95%igen VI ausgegangen. Je kleiner das rel. VI ist, in dem die 'tatsächliche' Kopienzahl liegt, desto präziser ist demnach die Schätzung. Nach dem von WAIBLINGER et al. (2001) vorgeschlagenen pragmatischen Ansatz zur Schätzung von NG und BG, wird die BG beim Erreichen des rel. VI von 30% erreicht. Bei Überschreiten einer 30%igen Streuung des rel. VI wird die Präzision so klein, dass keine quantitativen Angaben gemacht werden können. Durch die diskrete Verteilung der Kopienzahlen der Kalibrierstandards wird das 30%ige rel. VI nie exakt erreicht. Die Angabe der BG erfolgt daher in Form eines Kopienbereiches mit oberer und unterer Grenze, zwischen denen die unbekannte Kopienzahl, die dem 30%igen rel. VI (95%) entspricht, liegt. Analog der BG wird auch die NG über die rel. VI (95%)-Werte der Kalibrierstandards bestimmt. Eine 100%ige Streuung markiert die untere NG der Kopienzahlen. In Tabelle 3-2 bis 3-4 sind die statistischen Parameter für die Berechnung der rel. VI

bei den verschiedenen Kalibrierstandards aufgeführt. Es wird deutlich, dass die Schätzung der Kopienzahlen bei abnehmender Kopienzahl unpräziser und das rel. VI (95%) somit breiter wird. Die Kopien der Standards, zwischen denen sich die aus dem rel. VI abgeleiteten BG und NG befinden, sind in den Tabellen 3-2, 3-3, und 3-4 symbolisch durch Klammern hervorgehoben.

In den Abbildungen 3-19 und 3-20 ist die Veränderung der rel. VI (95%) bei abnehmender Kopienzahl der Zielsequenz graphisch dargestellt. Die Abbildungen zeigen deutlich, dass der Anstieg der rel. VI mit abnehmender Kopienzahl bei allen Standards bis auf den VP-Standard sehr ähnlich verläuft. Die VP- und MG-Standards überschreiten die 30%-Grenze der BG nicht. Die Kurve des rel. VI (95%) der MG-Standards steigt jedoch parallel zu denen der anderen Standards, während die rel. VI (95%)-Werte der VP-Standards kaum ansteigen.

Die Veränderung der Präzision des quantitativen P-35S PCR Assays in Kombination mit dem s_{gt}-Referenz PCR Assay ist in Abbildung 3-20 dargestellt. Beim VG-Standard des LL-Konstrukt Real-Time PCR Assays wurde ein anderes Kopienspektrum verwendet als beim VG_{35S} Standard. Durch den ähnlich flachen Anstieg des rel. VI (95%) im Vergleich zu den anderen Standards ist erkennbar, dass die Präzision des LL- und des P-35S Assays bei beiden Standards in der gleichen Größenordnung lag.

Tabelle 3-2: Präzision der Schätzung von LL-Konstrukt kopien für verschiedene Kalibrierstandards

H ₂ O-Verdünnte Standards	Kopien	m	Ct _{pat}	geschätzte Kopien	s	%VI (95%)	
VG	279 184	5	22,08	248 410	14 487	7,2	
	27 918	5	25,18	28 347	2 699	11,8	
	2 792	5	28,02	3 883	505	16,1	
	279	5	31,80	274	37	16,6	} BG NG
	28	5	35,52	23	11	59,6	
	2,8	3	37,97	4,8	3,6	189,8	
VP	1 259 015	5	18,22	*1 232 624	40 977	4,1	
	125 901	5	21,87	126 303	4 894	4,8	
	12 590	5	25,41	13 912	959	8,6	
	1 259	5	29,15	1 344	65	6,0	
	126	5	33,47	92	18	24,0	
	13	5	26,35	16	8,1	21,9	
	1,3	1	39,07	2,8	-	-	
Gemischte Standards	Kopien	m	DCt	geschätzte Kopien	s	%VI (95%)	
MS	220 859	5	2,01	258 636	25 011	12,0	
	23 558	5	6,05	16 521	1 356	10,2	
	2 209	5	9,22	1 908	210	13,7	
	206	5	11,34	450	50	15,6	} BG
	21	5	16,50	13	4,7	47,1	
MG	254 694	5	1,79	276 173	20 216	9,1	
	25 469	5	5,04	26 581	1 768	8,3	
	2 547	5	8,49	2 217	97	5,5	
	255	4	11,77	209	12	9,3	
	26	5	14,45	31	6,0	26,9	
MPG	213 211	5	1,71	188 912	19 294	12,7	
	21 321	5	4,90	20 731	2 394	14,3	
	2 132	4	7,94	2 522	298	14,7	
	213	5	11,32	244	29	18,6	} BG
	21	4	14,87	22	8,9	55,8	
	2,1	2	18,61	1,7	-	-	

m = Anzahl an Wiederholungen ohne Ausreißer; Ct = 'Threshold Cycle'; $\Delta Ct = Ct_{s_gt} - Ct_{pat}$; s = Standardabweichung; %VI (95%) = Vertrauensintervall geschätzter LL-Konstrukt Kopien (*pat*-Gen) bei einem 95%igen Wahrscheinlichkeitsniveau; Standards: VG = 'verdünnte genomische' DNA, VP = 'verdünnte plasmidale DNA', MS = 'gemischte Samen', MG = 'gemischte genomische DNA', MPG = 'gemischte plasmidale & genomische' DNA; *Erwartungswerte für *s_{gt}*-Gen und LL-Konstrukt Kopien nach dem T-Test ungleich; BG = Bestimmungsgrenze, NG = Nachweisgrenze.

Tabelle 3-3: Präzision der Schätzung von *s_{gt}*-Referenzkopien für H₂O-verdünnte Kalibrationsstandards

H ₂ O-Verdünnte Standards	Kopien	m	Ct _{<i>s_{gt}</i>}	geschätzte Kopien	s	%VI (95%)	
VG	279 184	5	21,05	249 403	17 984	9,0	
	27 918	5	24,22	28 822	2 507	10,8	
	2 792	5	27,10	4 121	195	7,5	
	279	5	31,22	247	22	10,8	
	28	4	35,12	18	2,9	26,5	
	2,8	2	36,37	5,4	-	-	
VP	1 259 015	5	17,60	1 159 261	56 439	6,0	
	125 901	5	21,12	132 101	4 785	4,5	
	12 590	5	24,74	14 121	1 181	10,4	
	1 259	5	28,46	1 426	157	13,7	
	126	4	33,09	82	6,4	12,4	} BG
	13	5	35,87	18	12,5	31,1	
	1,3	2	37,22	6,4	-	-	

m = Wiederholungen ohne Ausreißer; Ct = 'Threshold Cycle'; s = Standardabweichung; %VI (95%) = Vertrauensintervall der gemessenen *s_{gt}*-Gen Kopien bei einem 95%igen Wahrscheinlichkeitsniveau; Standards: VG = 'verdünnte genomische DNA', VP = 'verdünnte plasmidale DNA'; BG = Bestimmungsgrenze, NG = Nachweisgrenze.

Tabelle 3-4: Präzision der Schätzung von *s_{gt}*- und P-35S-Kopien für H₂O-verdünnte Kalibrierstandards

H ₂ O-Verdünnte Standards	Kopien	m	Ct _{35S}	geschätzte Kopien	s	%VI (95%)	
VG	382 000	5	21,55	*332 030	*2 861	1,1	
	38 200	3	24,31	*50 967	2 017	10,9	
	3 820	4	27,50	*4 871	111	3,7	
	382	4	30,93	*450	26	10,2	
	38	5	34,64	*38	6,6	27,9	} BG
	3,8	5	37,32	7,6	2,3	61,9	
H ₂ O-Verdünnte Standards	Kopien	m	Ct _{<i>s_{gt}</i>}	geschätzte Kopien	s	%VI (95%)	
VG	382 000	5	20,38	*420 831	*3 583	11,8	
	38 200	5	23,70	*41 281	1 965	6,3	
	3 820	4	26,99	*4 514	318	9,6	
	382	4	30,63	*381	30	10,6	
	38	4	33,80	*48	6,6	20,5	} BG
	3,8	3	37,22	6,7	2,0	61,0	

m = Wiederholungen ohne Ausreißer; Ct = 'Threshold Cycle'; s = Standardabweichung; %VI (95%) = Vertrauensintervall der gemessenen *s_{gt}*-Gen bzw. P-35S-Kopien bei einem 95%igen Wahrscheinlichkeitsniveau; Standards: VG = 'verdünnte genomische DNA'; *Erwartungswerte bzw. Varianzen für *s_{gt}*-Gen und P-35S Kopien nach dem T- bzw. F-Test ungleich; BG = Bestimmungsgrenze, NG = Nachweisgrenze.

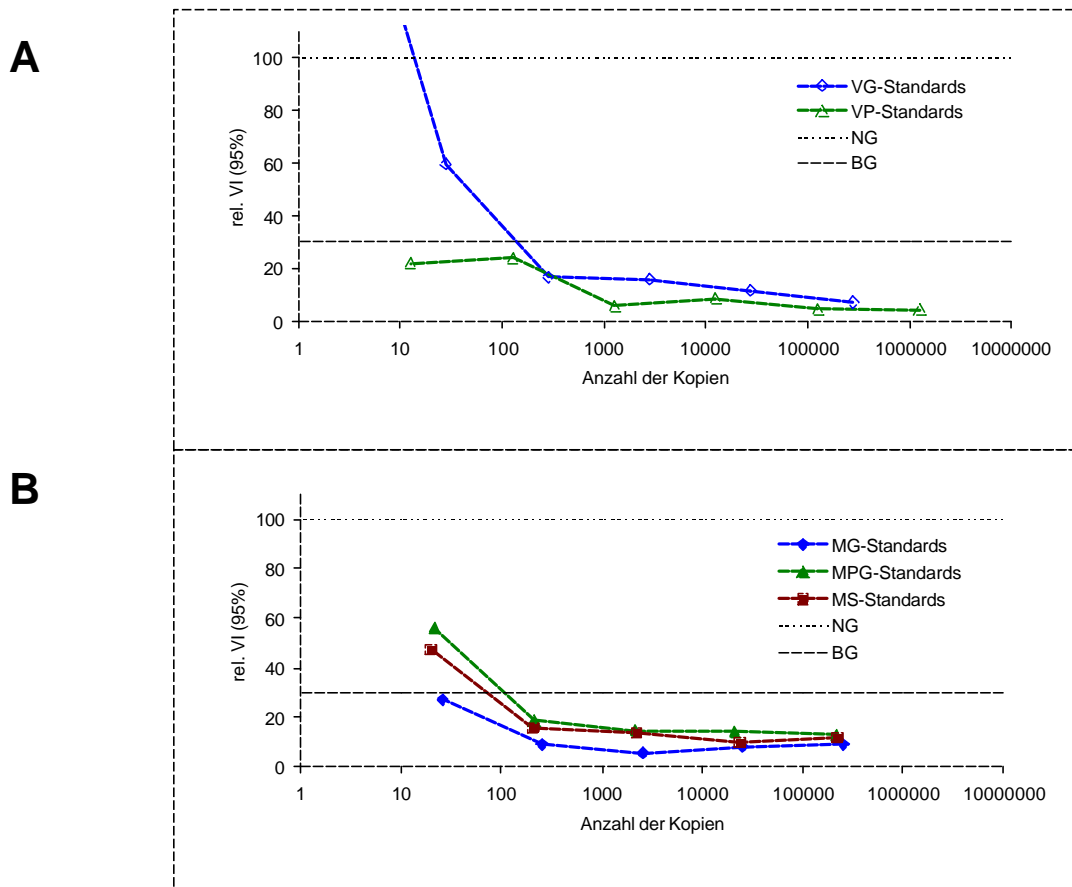


Abbildung 3-19: Ableitung der Bestimmungs- und Nachweisgrenzen über Vertrauensintervalle des quantitativen Nachweises des LL-Konstrukts

Darstellung der relativen VI (95%) Werte gegen die eingesetzten LL-Kopien; fein gestrichelte Linie: NG bei 30%, grob gestrichelte Linie: BG bei 100% VI (95%).

A: H₂O-verdünnte Standards: VG = 'verdünnte genomische' DNA, VP = 'verdünnte plasmidale' DNA.

B: gemischte Standards: MS = 'gemischte Samen', MG = 'gemischte genomische DNA', MPG = 'gemischte plasmidale & genomische' DNA.

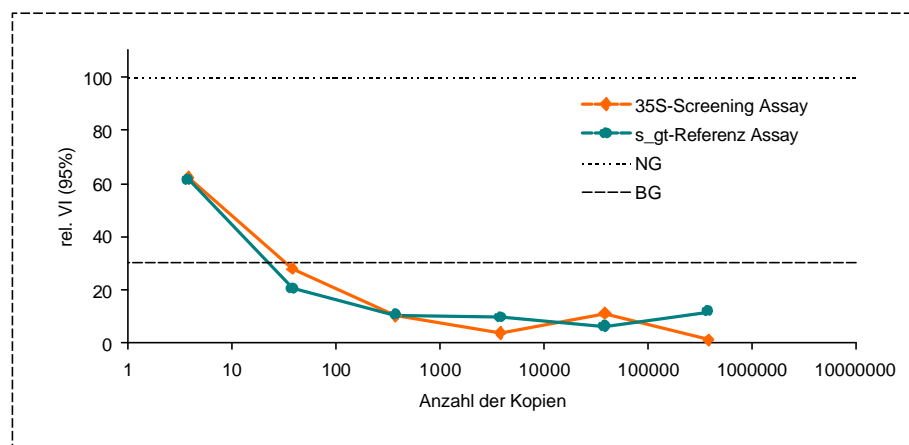


Abbildung 3-20: Ableitung der Bestimmungs- und Nachweisgrenzen über Vertrauensintervalle des quantitativen PCR-Nachweises des P-35S und des s_{gt}-Referenzgens

Darstellung der relativen VI (95%) Werte gegen die eingesetzten LL-Kopien; fein gestrichelte Linie: NG bei 30%, grob gestrichelte Linie: BG bei 100% VI (95%); H₂O-verdünnte Standards: VG-Standards 'verdünnte genomische' DNA mit dem Real-Time PCR P-35S Screening und s_{gt}-TM Referenz Assay.

Schätzung von Bestimmungs- und Nachweisgrenzen über die Kalibrierfunktion

Es gibt verschiedene Methoden, die BG und NG über die ermittelte Regression zu schätzen. Das Kopienintervall, zwischen dem sich das 30%ige bzw. 100%ige rel. VI von BG und NG der Kalibrierstandards befindet, wurde aus den Tabellen 3-2 bis 3-4 exzerpiert, in Tabelle 3-5 zusammengestellt und mit 'BG/NG Intervall' gekennzeichnet. Eine andere Möglichkeit der Schätzung von NG und BG erfolgt nach DIN 32 645 (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG 1994). Mit Hilfe der DIN 32 645 kann die NG und von dieser abgeleitet, auch die BG unter Verwendung der Messwerte der Kalibrierstandards exakt bestimmt werden (vgl. 2.2.9.5 Validierungsparameter). Als Grundlage für die Schätzung dient die Schwankung der Messwerte um die Regressionsgerade. Für die Standards wurden neben den bereits dargestellten Variablen die Verfahrensstandardabweichung ($s_{x.o}$) und die Reststandardabweichung ($s_{y.x}$) der Messwerte von der Kalibrierung erhoben (Tabelle 3-5). Die aus ihnen abgeleiteten BG und NG wurden in Tabelle 3-5 mit 'Exakt' gekennzeichnet.

Durch die Wahl der eingesetzten Kopienzahl der Standards konnte über die Methode der rel. VI nicht immer die untere Grenze der BG und NG angegeben werden, weil die entsprechende 30%- bzw. 100%-Schwelle nicht überschritten wurde. So konnte ausschließlich bei den VG-Standards die untere Grenze des 'NG-Intervalls' und hier nur für den LL-Assay angegeben werden. Die Angabe der unteren Grenze des 'BG-Intervalls' war dagegen mit Ausnahme der VG-Standards (s_{gt} Assay), der VP-Standards (LL Assay) sowie der MG-Standards (LL Assay) sowie der abgeleiteten Δ Ct-Regression bei allen Standards und PCR Assays möglich.

Die Bestimmung der 'NG/ BG-Exakt' lag meist deutlich unter der des 'NG/ BG-Intervalls'. Die Werte der 'NG-Exakt' waren stets kleiner oder gleich zwei Kopien, unabhängig von den Standards oder Assays. Die Werte der 'BG-Exakt' lagen stets unter sechs Kopien. Vergleicht man die Werte, so liegen die 'NG/ BG-Exakt' bereits außerhalb des Bereichs der 'NG/ BG-Intervall' (in der Tabelle 3-5 mit *gekennzeichnet), wenn die unteren Grenzen von 'NG/ BG-Intervall' angegeben werden konnten. Die einzige Ausnahme stellt der VG_{35S}-Standard mit dem P-35S Screening Assay dar, bei dem die 4,3 Kopien der 'BG-Exakt' in den Bereich des 'BG-Intervalls' von 3,8-38 Kopien fallen (Tabelle 3-5).

Tabelle 3-5: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen verschiedener Standards in der Real Time PCR

Kalibrier-standards	Ct	s _{x,o}	s _{y,x}	BG	NG	BG	NG
				Exakt	Exakt	Intervall	Intervall
VG	Ct _{pat}	0,16	0,52	*4,8	*1,6	28-279	2,8-28
	Ct _{s_{gt}}	0,15	0,52	4,8	1,6	<28	<28
VP	Ct _{pat}	0,13	0,46	4,3	1,4	<13	<13
	Ct _{s_{gt}}	0,23	0,81	*5,6	1,9	13-126	<13
MS	Ct _{pat}	0,15	0,52	*4,9	1,6	21-206	<21
	ΔCt	0,21	0,70	*5,9	2,0	21-206	<21
MG	Ct _{pat}	0,09	0,29	4,0	1,3	<26	<26
	ΔCt	0,08	0,24	3,8	1,3	<26	<26
MPG	Ct _{pat}	0,10	0,34	*4,1	1,4	21-213	<21
	ΔCt	0,11	0,38	*4,2	1,4	21-213	<21
VG _{35S}	Ct _{35S}	0,13	0,41	4,3	1,4	3,8-38	<3,8
	Ct _{s_{gt}}	0,07	0,52	*3,7	1,2	3,8-38	<3,8

Ct = 'Threshold Cycle'; ΔCt = Ct_{pat} - Ct_{s_{gt}}; s_{x,o} = Verfahrensstandardabweichung; s_{y,x} = Reststandardabweichung der Messwerte von der Kalibrierung; * Kennzeichnung der 'NG/ BG-Exakt'-Kopien die außerhalb der Kopien von 'NG/ BG-Intervall' liegen; Standards: VG = 'verdünnte genomische DNA', VP = 'verdünnte plasmidale DNA', MS = 'gemischte Samen', MG = 'gemischte genomische DNA', MPG = 'gemischte plasmidale & genomische DNA'; VG-Standards des LL-Konstrukts Assays (*pat*-Gen) und VG_{35S}-Standards des P-35S Assays haben verschiedene Kopienbereiche.

Bei den gemischten Standards konnten keine BG und NG für das s_{gt}-Referenzsystem angegeben werden, da die Standards stets die gleiche Konzentration an s_{gt}-Gen Kopien enthielten. Aus dem Verhältnis zwischen LL-Konstrukt zu s_{gt}-Gen Kopien kann jedoch eine relative BG und NG dieser Standards abgeleitet werden. Als Bezugspunkt dienen die LL-Kopien an der oberen Schwelle von 'BG/ NG-Intervall' bzw. von 'BG/ NG-Exakt'. Für die MS-Standards mit 206 000 s_{gt}-Kopien (126 ng), die MG-Standards mit 255 000 (156 ng) und die MPG-Standards mit 225 000 s_{gt}-Kopien (138 ng) lagen die 'relativen BG-Intervalle' unter 0,10%, 0,011% bzw. 0,10% und die 'relativen NG-Intervalle' unter 0,010%, 0,011% bzw. 0,010%. Beim Einsatz von MS-, MG-, und MPG-Standards konnten somit noch 126 pg, 17 pg und 138 pg LL- DNA bestimmt und 13 pg, 17 pg bzw. 14 pg LL-DNA nachgewiesen werden. Die 'NG/ BG-Exakt' waren deutlich niedriger. Für die MS-, MG- und MPG-Standards lagen die 'relativen BG-Exakt' jeweils bei 0,0024%, 0,0016%, 0,0009% und die 'relativen NG-Exakt' jeweils bei 0,0008%, 0,0005%, 0,0006%.

Wiederfindungsrate

Die Richtigkeit und Genauigkeit der Schätzung von Genkopien können durch die sogenannte Wiederfindungsrate (W) evaluiert werden. Sie gibt das prozentuale Verhältnis zwischen dem geschätzten und dem wahren Transgenanteil an. Als Maß zum Vergleich der Präzision unabhängiger Analysenergebnisse wurde der Variationskoeffizient (V_k) benutzt, der das Verhältnis von Standardabweichung zum Mittelwert angibt (vgl. 2.2.9.5. Validierungsparameter).

Zur Bestimmung von W und V_k wurden je vier Referenzproben mit den verschiedenen Kalibrierstandards 'rückquantifiziert' (Tabelle 3-6). Durch die Regression der gemittelten Soll- und Schätzwerte wurde eine Wiederfindungsfunktion (W_F) erstellt. Die W_F für den LL-Konstrukt Assay mit verdünnten (A) und gemischten (B) Kalibrierstandards sowie für den P-35S-Screening-Assay mit den VG_{35S}-Standards zeigen die Abbildungen 3-21 und 3-22. Nach WAIBLINGER et al. (2001) ist die Steigung der Wiederfindungsfunktion ein Maß für die Empfindlichkeit der Methode und sollte zwischen 0,7 und 1,2 liegen. Die Steigungen der W_F für die VP-, MG- und MPG-Standards lagen mit 0,84, 1,07 bzw. 1,03 innerhalb dieser Grenzwerte. Bei einer optimalen Wiederfindung besitzt W_F eine Steigung von 1,0. In den Abbildungen 3-21 und 3-22 wird diese optimale Wiederfindung durch eine punktierte Linie (100% Wiederfindung) dargestellt.

Tabelle 3-6: Wiederfindungsraten des quantitativen Nachweises von LibertyLink®-Raps für verschiedene Kalibrierstandards

Kalibrierstandards	0,5% LL			1,0% LL			5,0% LL			10,0% LL		
	LL%	V_k %	W%	LL%	V_k %	W%	LL%	V_k %	W%	LL%	V%	W%
VG	0,3	± 0,48	66	0,7	± 0,98	69	2,7	± 0,77	53	7,4	± 0,82	74
VP	0,5	± 0,81	106	1,6	± 0,90	164	5,9	± 0,60	117	12,3	± 0,32	123
MS	0,4	± 1,57	75	0,6	± 0,80	63	2,7	± n.b.	54	7,5	± 0,25	75
MG	0,3	± 0,69	64	0,8	± 0,81	83	4,5	± 0,63	91	9,2	± 0,14	92
MPG	0,6	± 1,23	126	1,4	± 0,94	142	5,1	± 0,96	101	10,0	± 0,76	100
VG _{35S}	0,4	± 0,27	71	1,0	± 0,38	101	3,5	± 2,52	70	7,8	± 0,69	78

LL% = LibertyLink®-Anteil in Prozent, V_k % = Variationskoeffizient in Prozent, W% = Wiederfindungsrate des Transgenanteils in Prozent, n.b. = nicht bestimmt; Standards: VG = 'verdünnte genomische DNA', VP = 'verdünnte plasmidale DNA', MS = 'gemischte Samen', MG = 'gemischte genomische DNA', MPG = 'gemischte plasmidale & genomische DNA'; der VG-Standard des LL-Konstrukt (*pat*-Gen) Assays und VG-Standard des P-35S Assays haben verschiedene Kopienbereiche.

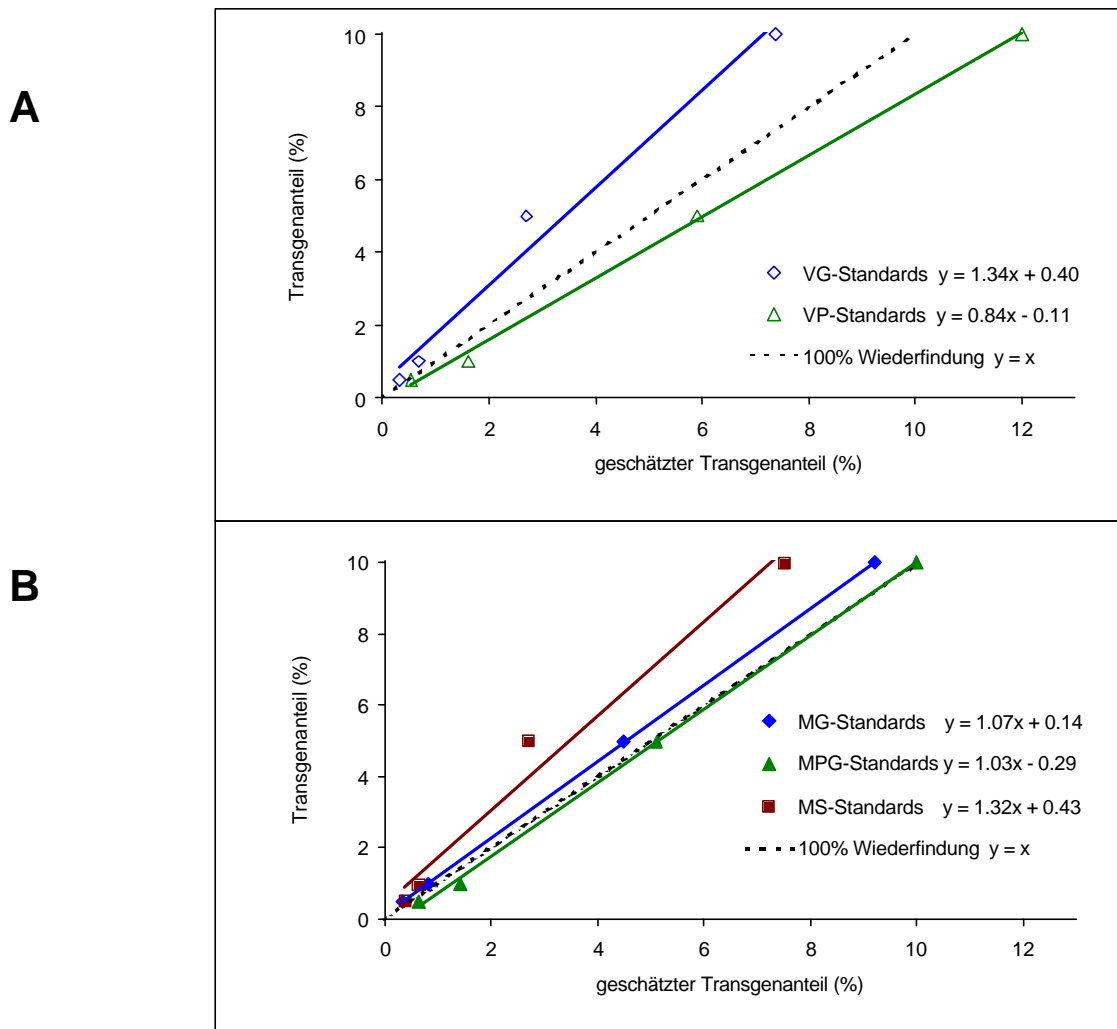


Abbildung 3-21: Wiederfindungsfunktionen des Real-Time PCR Assays für das LL-Konstrukt mit verschiedenen Kalibrierstandards

Darstellung der optimalen Wiederfindungsfunktion (100%) durch Punktierung.

A: H₂O-verdünnte Standards: VG = 'verdünnte genomische' DNA, VP = 'verdünnte plasmidale' DNA.

B: gemischte Standards: MS = 'gemischte Samen', MG = 'gemischte genomische DNA', MPG = 'gemischte plasmidale & genomische' DNA.

Standards, deren V_k zwischen 0,4 –1,0% lagen, zeigten eine gleichbleibende Präzision über einen Messbereich von 0,5% bis 5,0% Transgenanteil (Tabelle 3-6). Bei dem hohen LL-Anteil von 10,0% ist die Präzision allgemein höher. Bei dem niedrigen LL-Transgenanteil von 0,5% wurden MS- und MPG-Standards unpräzise und die V_k stiegen auf über 1,2%. Der MS-Standard zeigte zudem eine auffällige Schwankung in der Präzision zwischen 0,5% und 10,0% LL-Anteil mit V_k von 1,57% bzw. 0,25%. Der VG_{35s}-Standard hatte einen ungewöhnlich hohen V_k bei 5,0% LL-Konstrukt.

Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 53% und 164%, womit die stärkste Abweichung vom Erwartungswert nach oben bzw. unten 47% und 64% betrug (Tabelle 3-6). Alle Kalibrierstandards zeigten eine hohe Richtigkeit und Genauigkeit. Entsprechend der guten W_F von 1,03 und 1,07 (Abbildung 3-21 und 3-22) zeigten die MG- und MPG-Standards mit 69% bzw. 70% auch die geringsten Gesamtabweichungen über alle vier LL-Transgenanteile.

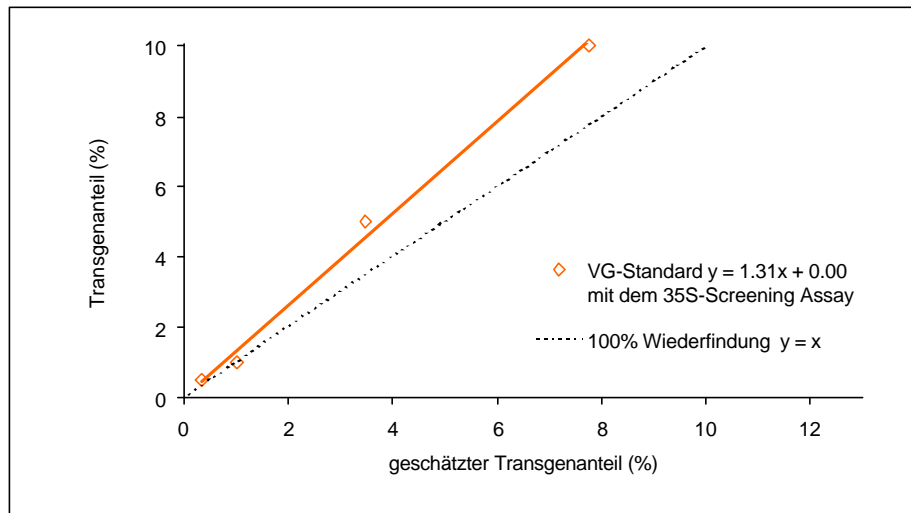


Abbildung 3-22: Wiederfindungsfunktion (W_F) des Real-Time PCR Assays den P-35S mit verdünnten Kalibrierstandards
 Darstellung der optimalen Wiederfindungsfunktion (100%) durch Punktierung.
 H_2O -verdünnte Standards: VG_{35S} = 'verdünnte genomische DNA' Standards mit dem P-35S Screening Real-Time PCR Assay.

3.3 Persistenz von transgenem Raps auf bayerischen Agrarflächen

Das Erntegut sowie der Ausfallraps in den Folgekulturen von fünf ausgewählten Agrarflächen, die im Jahre 2000 versehentlich mit transgen kontaminiertem Sommerrapssaatgut bestellt worden waren, wurden beprobt und die Transgenanteile mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR untersucht (vgl. Kapitel 2.2.1). Es konnte sowohl das *epsps*-Gen als auch das *pat*-Gen nachgewiesen werden. Beide Gene kodieren für eine transgene Toleranz gegen Herbizide. Ersteres vermittelt durch die Expression einer 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSPS) eine Toleranz gegenüber dem Wirkstoff Glyphosat (Roundup Ready®, RR) und das zweite durch Expression einer Phosphinothricinacetyltransferase (PAT) eine Toleranz gegen Phosphinothricin (LibertyLink®-Linien, LL).

3.3.1 Beschreibung der untersuchten Agrarflächen

Die regionale Verteilung der fünf betroffenen Agrarflächen in Bayern ist in Abbildung 2-1 dargestellt. Wichtige pflanzenbauliche Parameter sowie Angaben zur Bodenbearbeitung der 'transgen kontaminierten' Flächen sind in den Tabellen 3-7 und 3-8 zusammengefasst.

Tabelle 3-7: Pflanzenbauliche Parameter der 'transgen kontaminierten' Agrarflächen

Nr.	Fläche		Bodenart	Saatstärke (kg/ha)	Ø Ertrag (dt/ha)
		ha			
1		13,8	anmoorig, humos	6,5	22
2		11,6	toniger Lehm	4,0	15
3		6,0	toniger Lehm	5,0	25
4		1,3	schluffiger Lehm	6,0	17
5		5,0	schluffiger Lehm	5,0	22

Ø = durchschnittlich

Tabelle 3-8: Bodenbearbeitung auf den 'transgen kontaminierten' Agrarflächen

Saison		Fläche 1	Fläche 2	Fläche 3	Fläche 4	Fläche 5
2000	Herbst	Pflug	Grubber	Pflug	Pflug	Grubber
2001	Frühjahr	Kreiselegge	-	-	-	Saatfräse
2001	Herbst	-	Pflug	Pflug	Pflug	Pflug
2002	Frühjahr	Kreiselegge	-	Grubber	Grubber	Grubber
2002	Herbst	-	Grubber	2x Grubber	Pflug	Pflug
2003	Frühjahr	-	-	Saatfräse	-	Grubber

Auf Fläche 2 wurde im Herbst 2001 der rapsverwandte Ackersenf ausgesät. Im Frühjahr 2002 erfolgte auf dieser Fläche eine Glyphosatapplikation vor der Folgekultur sowie eine jährliche RR-Randbehandlung vom Landwirt.

Direkt im Anschluss an die Kultur des 'transgen kontaminierten' Rapses wurde Fläche 4 im Herbst 2000 mit einem glyphosathaltigen Mittel komplett abgespritzt. Auf derselben Fläche erfolgte im Herbst 2002 einmalig eine Glyphosatapplikation an den Feldrändern.

3.3.2 Quantifizierung der Transgenanteile

Die Beprobung und Quantifizierung des Saatguts geschah extern durch das Landesamt für Umweltschutz (LfU) Augsburg. Fünf Erntegutproben von je 80 g wurden während des Dreschens in randomisierten zeitlichen Abständen genommen. Zur Homogenisierung dienten Proben mit je 3500 Körnern. Vom Ausfallraps erfolgte nach Möglichkeit eine Ziehung von je 3000 Pflanzen. Jeweils 1000 von ihnen gingen in eine homogenisierte Mischprobe ein. Wurden weniger als 3000 Pflanzen gefunden, sind die entsprechenden statistischen Parameter in den Tabellen gekennzeichnet und die Pflanzenzahl in der Tabellenbeschriftung aufgeführt.

Die Untersuchung der Proben auf ein Vorhandensein *pat*-transgener Anteile erfolgte mit den entwickelten Real-Time PCR Assays für das LL-Konstrukt in Kombination mit dem *Brassica* spezifischen *s_gt*-TM Referenz Assay. Um die quantifizierten Transgenanteile angeben zu können, müssen die Messdaten oberhalb der BG liegen. Übersteigen sie die NG, können die Proben lediglich mit 'positiv transgen' beurteilt werden. Als Grenzwerte zur Beurteilung der quantifizierten Proben dienten die exakt errechneten Kopien der 'NG/ BG-Exakt', die sich aus der Streuung der Messpunkte der Kalibrierstandards um die Kalibriergrade ableiten (siehe Tabelle 3-9; vgl. Kapitel 2.2.9). Diese Ableitung von NG und BG erlaubt eine exakte Angabe von Genkopien und war daher für diese Fragestellung besonders geeignet. Aus dem Verhältnis der LL-Konstrukt Kopien an der 'NG- und 'BG-Exakt' zu den *s_gt*-Kopien jeder Probe konnte eine relative 'NG/ BG-Exakt' berechnet werden (vgl. Kapitel 2.2.9, relative 'NG/ BG-Exakt' bei gemischten Standards). LL-Konstrukt Kopienzahlen, die sich entweder unter 'NG-Exakt' befanden oder deren ermittelte Transgenanteile unter der relativen 'NG-Exakt' (oder beides) waren, wurden als negativ gewertet. LL-Konstrukt Kopienzahlen, die zwischen 'NG- und BG-Exakt' lagen oder Transgenanteile, die zwischen den relativen 'NG/ BG- Exakt' lagen, erhielten die Bewertung positiv. Bei Kopienzahlen oder Transgenanteilen, die sich über der 'BG-Exakt' und über der relativen 'BG- Exakt' befanden, erfolgte eine Quantifizierung.

Die berechneten *pat*-Transgenanteile für alle Saatgut-, Erntegut- und Ausfallrapsproben der Jahre 2000 bis 2002 aus den fünf landwirtschaftlichen Praxisflächen sowie deren Proben spezifische relative NG und BG sind in Tabelle 3-9 zusammengestellt.

Die *pat*-Transgenanteile von Tabelle 3-9 ergaben sich aus dem Mittelwert der Wiederholungsmessungen (n) für jede Probe. Der Mittelwert (\bar{x}) der Proben ergab den LL-Transgenanteil

(*pat*-Gen) der Mischprobe, wobei positive Werte nicht und negative Werte als Nullwerte in die Kalkulation eingingen.

Die Gegenüberstellung der *pat*-Transgenanteile für einzelne Stichproben wurde vorgenommen, um die z.T. erheblichen Schwankungen zwischen den Einzelergebnissen hervorzuheben. Solche Schwankungen findet man bei Erntegutproben aller Flächen. Nur Fläche 4 war immer negativ. Im Ausfallraps erschienen solche Schwankungen im Herbst 2001 bei Fläche 5 und im Frühjahr 2002 bei Fläche 3 und 5. Diese können durch eine ungleichmäßige Verteilung des transgenen Ausfallraps auf dem Feld, die Beprobung oder den Schwankungsbereich der PCR-Analytik verursacht worden sein.

Weiterhin sind die relativen 'NG/ BG-Exakt' als Entscheidungskriterium für die Bewertung in negativ, positiv und quantifiziert in Tabelle 3-9 für jede Probe aufgeführt. Um die Endergebnisse der Quantifizierung besser hervorzuheben, wurden die Mittelwerte (\bar{x}) der geschätzten LL-Transgenanteile in Tabelle 3-10 zusammengestellt. In Tabelle 3-11 ist neben dem Mittelwert der LL- bzw. RR-Transgenanteile der Variationskoeffizient (V_k) zwischen den gesammelten Proben aufgeführt. V_k gibt die relative Streuung der Proben im Verhältnis zum Mittelwert an. Die hohen V_k von 32% - 174% beim LL-Transgenanteil und von 37% - 106% beim RR-Transgenanteil deuten auf Inhomogenitäten zwischen den Einzelproben hin.

Die LL-Transgenanteile der fünf untersuchten Agrarflächen konnten mit dem entwickelten LL-Konstrukt in Kombination mit dem *Brassica* spezifischen *s_{gt}*-Referenz Real-Time PCR Assay exakt bestimmt werden (Tabelle 3-9). Die RR-Transgenanteile sowie die Saatgutanalyse auf LL-Transgenanteile wurden extern vom LfU Augsburg bestimmt. Die Veränderung der LL- bzw. RR-Anteile in Rapsproben der Agrarflächen vom Saatgut im Jahr 2000 bis zum Auflaufraps im Herbst 2002 wurde in Tabelle 3-10 und Tabelle 3-11 zusammengefasst. Die extern bestimmten LL- und RR-Anteile des Saatgutes wurden stets in 'kleiner als' (<) angegeben. 'Kleiner als' lassen sich nicht grafisch darstellen. Zur grafischen Darstellung dieser Werte wurde in den Abbildungen 3-24 und 3-25 ein um 1% kleinerer Wert als der Grenzwert gewählt.

Aus diesen Abbildungen wird deutlich, dass die fünf Agrarflächen allgemein stärker mit RR- als mit LL-Samen kontaminiert waren. Das Saatgut hatte bereits einen höheren Anteil an RR- als an LL-Samen mit 0,4% bzw. 0,2%. Im Folgenden wird die Veränderung der Transgenanteile auf den fünf Agrarflächen vom Saatgut bis zum Ausfallraps für jede Fläche detailliert beschrieben.

Tabelle 3-9: Geschätzte LL-Transgenanteile von einzelnen Stichproben der 'transgen kontaminierten' Agrarflächen

Nr	n	Fläche 1			Fläche 2			Fläche 3			Fläche 4			Fläche 5			
		LL (%)	NG (%)	BG (%)	LL (%)	NG (%)	BG (%)	LL (%)	NG (%)	BG (%)	LL (%)	NG (%)	BG (%)	LL (%)	NG %	BG %	
Saatgut																	
F 2000		(-)	n. b.	n. b.	<0,2	n. b.	n. b.	<0,2	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	
Erntegut																	
H 2000	1	6	(-)	0,090	0,271	(+)	0,005	0,016	(-)	0,372	1,115	(-)	0,068	0,204	(-)	0,007	0,020
	2	6	(-)	0,008	0,024	0,032	0,010	0,029	(-)	0,043	0,128	(-)	0,028	0,084	0,042	0,004	0,011
	3	6	(-)	0,006	0,017	0,067	0,022	0,067	(+)	0,036	0,109	(-)	0,021	0,063	0,076	0,006	0,017
	4	6	(-)	0,004	0,012	0,104	0,008	0,024	(+)	0,091	0,274	(-)	0,006	0,020	0,164	0,007	0,021
	5	6	(+)	0,004	0,012	0,189	0,013	0,040	0,022	0,014	0,042	(-)	0,023	0,070	0,188	0,018	0,055
\bar{x}		(+)	0,098			0,007			0,007			(-)			0,094		
Ausfallraps																	
H 2001	1	3	0,032*	0,002	0,007	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	(-)	0,001	0,002	(-)	0,001	0,002
	2	3	0,036*	0,000	0,001	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	(-)	0,001	0,002	(-)	0,002	0,007
	3	3	0,039*	0,000	0,000	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	(-)	0,001	0,002	0,439	0,001	0,002
\bar{x}		0,036	n. b.			n. b.			n. b.			(-)			0,146		
F 2002	1	3	(-)	0,027	0,062	n. b.	n. b.	n. b.	(-)	0,002	0,006	(-)	0,004	0,013	(-)	0,002	0,005
	2	3	(-)	0,012	0,035	n. b.	n. b.	n. b.	(-)	0,002	0,007	(-)	0,154	0,463	0,080	0,002	0,005
	3	3	(-)	0,032	0,096	n. b.	n. b.	n. b.	0,046	0,002	0,007	(-)	0,042	0,127	0,158	0,002	0,005
\bar{x}		(-)	n. b.			n. b.			0,015			(-)			0,079		
H 2002	1	2	*(-)	0,006	0,018	n. b.	n. b.	n. b.	(+)	0,162	0,486	(-)	0,003	0,001	0,052 [♦]	0,002	0,006
	1	2	*(-)	0,004	0,011	n. b.	n. b.	n. b.	(+)	0,003	0,009	(-)	0,003	0,001	0,082 [♦]	0,002	0,006
\bar{x}		*(-)	n. b.			n. b.			(+)			(-)			0,067[♦]		

Externe Datenerhebung der Transgenanteile des Saatguts durch das LfU Augsburg; LL = LibertyLink®-Toleranz, H = Herbst, F = Frühjahr, NG % und BG % = relative (exakte) Nachweis- und Bestimmungsgrenze, n. b. = nicht bestimmt, \bar{x} = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen; Nr. = Anzahl der untersuchten Mischproben: Erntegut à 3200 Samen, Ausfallraps à 1000 Pflanzen; *dieselben Proben à 3000 Pflanzen in Nr. 1, 2, 3 Wiederholungen gemessen; im Herbst 2002 wurden Doppelmessungen von Proben à 3000 Pflanzen durchgeführt, bzw. [♦] à 1000 Pflanzen, * à 2309 Pflanzen; Negativwerte (-) sind als Nullwerte und Positivwerte (+) sind nicht in die Berechnung statistischer Werte eingegangen.

Tabelle 3-10: Durchschnittliche LL-Transgenanteile der 'transgen kontaminierten' Agrarflächen

Nr.	n	Fläche 1		Fläche 2		Fläche 3		Fläche 4		Fläche 5		
		\bar{x} (%)	V_k (%)	\bar{x} (%)	V_k (%)	\bar{x} (%)	V_k (%)	\bar{x} (%)	V_k (%)	\bar{x} (%)	V_k (%)	
Saatgut												
F 2000		(-)	n. b.	<0,2	n. b.	<0,2	n. b.	n. b.	n. b.	<0,2	n. b.	
Erntegut												
H 2000	1-5	6	(+)	(-)	0,10	69	0,01	173	(-)	(-)	0,09	85
Ausfallraps												
H 2001	1-3	2	*0,04	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	(-)	(-)	0,15	173	
F 2002	1-3	2	(-)	(-)	n. b.	n. b.	0,02	174	(-)	(-)	0,08	99
H 2002	1	2	*(-)	(-)	n. b.	n. b.	(+)	(-)	(-)	(-)	♦0,07	32

Externe Datenerhebung der Transgenanteile des Saatguts durch das LfU Augsburg; H= Herbst, F= Frühjahr, n. b. = nicht bestimmt, \bar{x} = Mittelwert, V_k = Variationskoeffizient, n = Messungen (Wiederholungen), Nr. = Anzahl der Proben mit: Erntegut à 3200 Samen, Ausfallraps à 1000 Pflanzen; * dieselben Proben à 3000 Pflanzen in 1,2,3 gemessen (Wiederholungen); im Herbst 2002 wurden Doppelmessungen von Proben à 3000 Pflanzen durchgeführt, bzw. ♦ à 1000 Pflanzen, * à 2309 Pflanzen; (-)-Werte wurden als Nullwerte und (+)-Werte sind nicht in die Berechnung statistischer Werte eingegangen.

Tabelle 3-11: Durchschnittliche RR-Transgenanteile der 'transgen kontaminierten' Agrarflächen

Nr.	n	Fläche 1		Fläche 2		Fläche 3		Fläche 4		Fläche 5		
		\bar{x} (%)	V_k (%)	\bar{x} (%)	V_k (%)	\bar{x} (%)	V_k (%)	\bar{x} (%)	V_k (%)	\bar{x} (%)	V_k (%)	
Saatgut												
F 2000		n. b.	n. b.	<0,4	n. b.	<0,4	n. b.	n. b.	n. b.	<0,4	n. b.	
Erntegut												
H 2000	1-5	6	<0,25	n. b.	0,09	37	0,11	71	<0,25	n. b.	0,13	80
Ausfallraps												
H 2001	1-3	3	0,36	15	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	<0,05	n. b.	0,21	5
F 2002	1-3	3	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	0,36	3	<0,25	n. b.	0,35	15
H 2002	1-3	3	0,29	18	n. b.	n. b.	0,33	10	<0,08	n. b.	0,21	106

Externe Datenerhebung der Transgenanteile des Saatguts durch das LfU Augsburg; bei negativen RR-Konzentrationen wurde die höchste NG (<) der n Messungen angegeben; H= Herbst, F= Frühjahr, n.b. = nicht bestimmt, \bar{x} = Mittelwert, V_k = Variationskoeffizient, n = Messungen (Wiederholungen), Nr. = Anzahl der Proben.

Für Fläche 1 wurde im Saatgut weder der LL- noch der RR-Anteil bestimmt. Im Erntegut zeigte sich jedoch ein LL-Anteil unterhalb der BG, im Ausfallraps Herbst 2001 war der LL-Anteil mit 0,04% quantifizierbar, und sank im Ausfallraps vom Frühjahr und Herbst 2002 wieder unter die NG. Der RR-Anteil von Fläche 1 blieb dagegen im Erntegut und im Ausfallraps der bestimmten Proben auf einem Niveau von ca. 0,3%.

Unter der Berücksichtigung, dass die für das Saatgut extern ermittelten Werte in Tabelle 3-10 und 3-11 Grenzwerte und keine exakt bestimmten Werte darstellen, zeigen die Flächen 2, 3 und 5 ein in etwa gleichbleibendes Niveau an transgener LL- und RR-Kontamination.

Aufgrund wetterbedingter Schwierigkeiten bei der Beprobung der Felder (Erdrutschgefahr an der Hanglage) war die Datenerhebung von Fläche 2 vom Herbst 2001 bis Herbst 2002 unmöglich. Der LL-Anteil von Fläche 2 blieb vom Saatgut (<0,2%) bis zum Erntegut (0,1%) auf ungefähr gleichem Niveau. Der RR-Transgenanteil von Saat- bzw. Erntegut lag unter 0,4% bzw. 0,09%, was ein Sinken des RR-Anteils bedeutet.

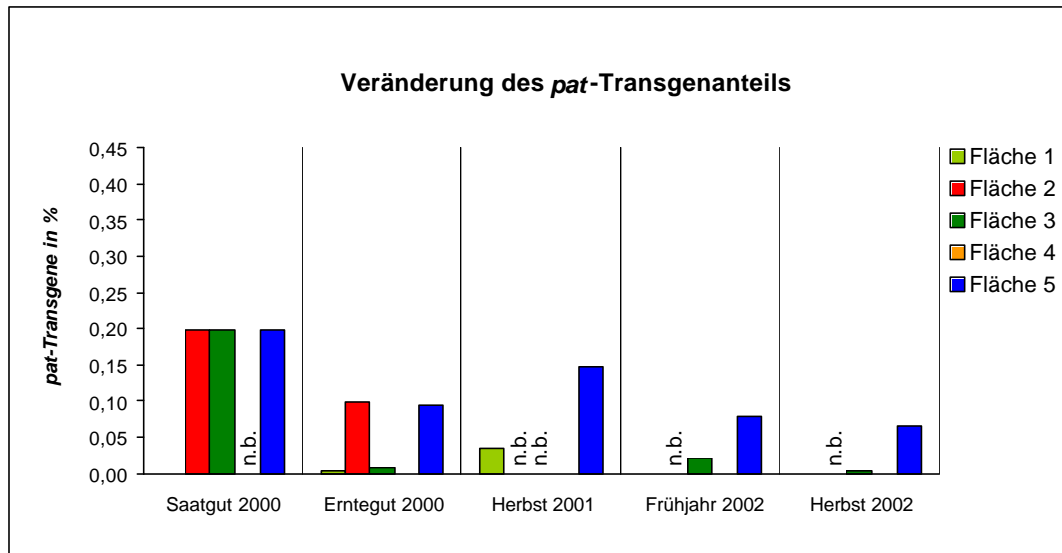


Abbildung 3-23: Veränderung des Anteils LibertyLink®-toleranter GVP auf den 'transgen kontaminierten' Agrarflächen
pat = Phosphinothricinacetyltransferase-Gen; n.b. = nicht bestimmt

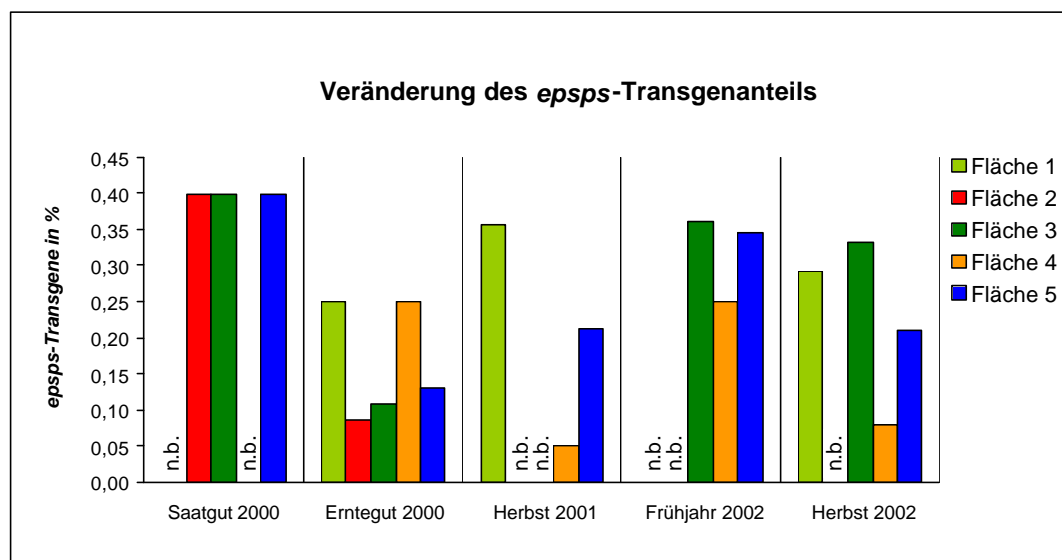


Abbildung 3-24: Veränderung des Anteils RoundupReady®-toleranter GVP auf den 'transgen kontaminierten' Agrarflächen
epsps = 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase-Gen; n.b. = nicht bestimmt

Im Herbst 2001 konnten auf Fläche 3 wetterbedingt keine Proben genommen werden. Sowohl der LL- als auch der RR-Anteil dieser Fläche sanken vom Saat- zum Erntegut 2000 von <0,2% auf 0,01% bzw. von <0,4% auf 0,11%. Der LL-Anteil schwankte im Auflauftraps um

ein Niveau von durchschnittlich 0,01% vom Herbst 2001 (unter der NG), bis zum Frühjahr und Herbst 2002 (0,02% bzw. unter der BG von 0,006%). Der RR-Anteil sank im Vergleich zum Erntegut (0,4%) zunächst im Herbst 2001 (0,11%) und stieg dann wieder auf ein 0,35%-Niveau an im Frühjahr (0,36%) und Herbst 2002 (< 0,33%).

Fläche 4 zeigte während des gesamten Beprobungszeitraumes keine transgene Kontamination. Die LL-Anteile von Fläche 5 ermöglichten einen Mittelwertsvergleich (vgl. Kapitel 2.2.9.5), um festzustellen, ob sich der LL-Transgenanteil des Ausfallrapes der verschiedenen Vegetationsperioden im Vergleich zum Erntegut verändert hat. Die LL-Transgenanteile vom Erntegut 2000 unterschieden sich nicht signifikant von denen der Ausfallrapen vom Herbst 2001, Frühjahr 2002 und Herbst 2002 (Signifikanzniveau $\alpha = 0,24$; 0,19 bzw. 0,36).

Selbst zwei Jahre nach der Aussaat transgen kontaminierten Saatguts konnte noch GV-Raps auf den Feldern nachgewiesen werden. Es zeichnet sich kein genereller Trend der Zu- oder Abnahme von Transgenanteilen vom Saatgut, Erntegut und Ausfallraps über die zwei beprobten Jahre ab. Im Jahre 2002 konnte tendenziell eine geringere Rate von Ausfallraps festgestellt werden. Die Anteile an RR- und LL-Pflanzen scheinen jedoch auf einem bestimmten Niveau stabil zu bleiben.

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte System aus LL-Konstrukt und *Brassica* spezifischem *s_gt*-Referenz Assay hat sich zur Analyse von Praxisproben bewährt. Es konnte gezeigt werden, dass die entwickelte Methode ein hohes Maß an Präzision aufweist und über geeignete Statistiken eine exakte Absicherung der Daten erlaubt. Bei den durchgeführten Analysen war die Nachweisempfindlichkeit so gering, dass selbst *pat*-Gen haltige Kontaminationen von nur 0,02% exakt bestimmen werden konnten. Damit wurde ein spezifisches Analysesystem von hoher Sensitivität entwickelt, das zur Prüfung der kürzlich verabschiedeten Schwellenwerte von 0,5% und 0,9% für Beimischungen von nichtzugelassenen bzw. zugelassenen GVP in Lebens- und Futtermittelzutaten sehr gut geeignet ist. Wegen der hohen Spezifität des LL-Konstrukt Ansatzes (vgl. Kapitel 3.1.4), ist das entwickelte System insbesondere auch zur Klärung von GVP-Kontaminationsquellen (Verursacher) nützlich.

4 DISKUSSION

Seit der Einführung der 'Grünen Gentechnik' hat der Anteil von GVP an der globalen Produktion von Agrarprodukten jährlich im Durchschnitt um über 10% zugenommen (JAMES 2003). Seit dem Jahr 2003 ist die Inverkehrbringung von GVP auch in den EU-Staaten einheitlich geregelt. Die verabschiedeten Verordnungen über die Zulassung, Kennzeichnung und Rückverfolgbarkeit von GVO-Lebens- und -Futtermitteln erhielten ihre Wirksamkeit am 18. April 2004. Regelungen bezüglich der Koexistenz konventioneller und GVP-anbauender Landwirtschaft wurden in dem neuen Gentechnikgesetz festgelegt (BIOSICHERHEIT 2004a).

Um mögliche Gefahren beim Anbau und der Nutzung von GVP für Verbraucher und Umwelt vorsorglich aufzudecken, wurden in Europa eine Vielzahl von Projekten zur Sicherheitsforschung initiiert. Allein in Deutschland erfolgte zwischen 1987 und 2001 eine Förderung von 110 Vorhaben zur Sicherheitsforschung der Gentechnik durch das Bundesforschungsministerium. Seit 2000 stehen 8 Mio. Euro pro Jahr für diesen Zweck zur Verfügung (BARTSCH 2002). Im Fokus dieser Projekte steht die Abschätzung der Größenordnung eines unerwünschten horizontalen und vertikalen Gentransfers eingeführter 'Fremdgene' während des landwirtschaftlichen Anbaus sowie die Etablierung von effektiven GVO-Nachweisverfahren zur Einhaltung von Schwellenwerten im internationalen Handel.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines bayerischen Monitoringprojektes für GVP durchgeführt, mit dem Ziel der Entwicklung und Validierung molekularer Nachweisverfahren für herbizidtoleranten GV-Raps. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war die Optimierung der PCR-Nachweissysteme durch die Erstellung sensitiver und robuster DNA-Kalibrierstandards sowie die Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit. Abschließend wurden die PCR-Nachweissysteme zur Quantifizierung der Transgenanteile von Praxisproben eingesetzt. Es zeigte sich, dass mit Hilfe der entwickelten Methodik die Persistenz herbizidtoleranter Rapspflanzen auf transgen kontaminierten Agrarflächen exakt bestimmt werden konnte.

4.1 Molekulare Nachweisverfahren für gentechnisch veränderte Pflanzen

4.1.1 Spezifität von PCR-Nachweisverfahren in der Analytik von GVP

In der vorliegenden Arbeit wurden qualitative und quantitative PCR-Systeme verschiedener Spezifität zum Nachweis von herbizidtoleranten Rapspflanzen entwickelt und evaluiert. Grundsätzlich können die PCR-Nachweissysteme für GVP aufgrund ihrer Spezifität in vier Kategorien eingeteilt werden. Jede Kategorie bezieht sich auf die Zusammenstellung der DNA-Fragmente, die bei einer PCR amplifiziert werden und so die Spezifität des PCR Assays bedingen. In Abbildung 4-1 sind die verschiedenen Kategorien von PCR Assays schematisch dargestellt. Die Spezifität nimmt in der Abbildung von oben nach unten zu.

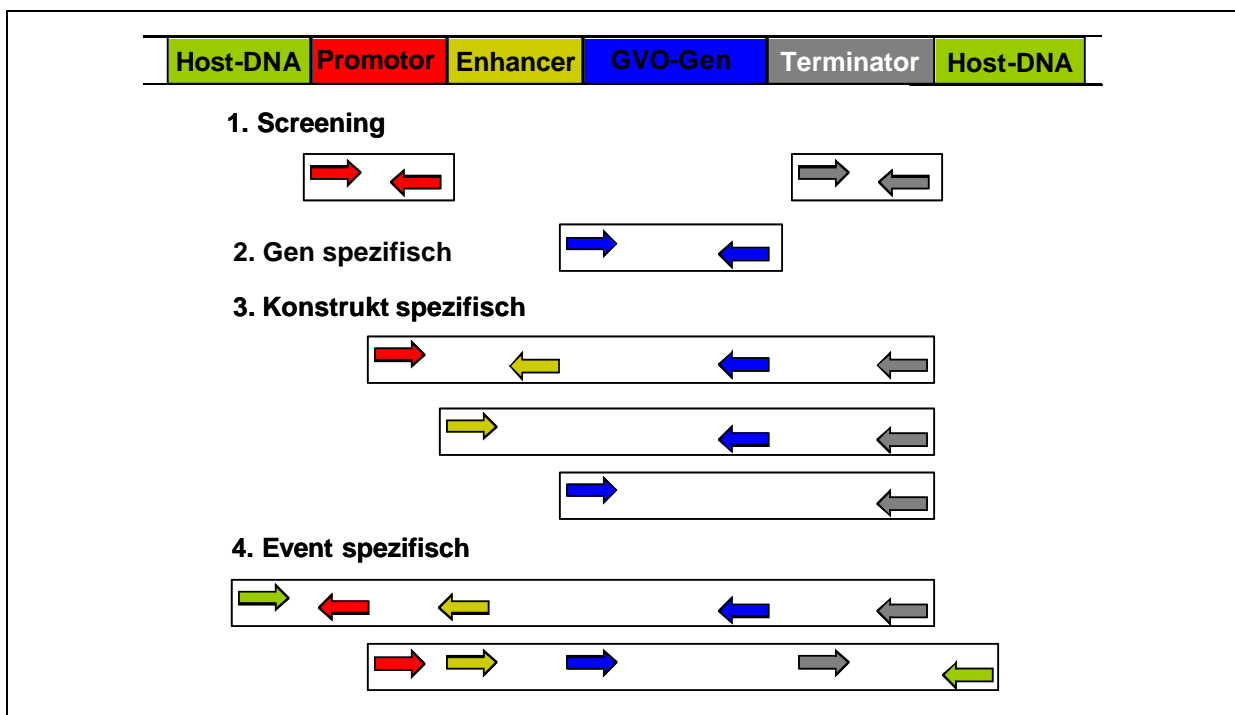


Abbildung 4-1: Die Spezifität von PCR Systemen zum GVP-Nachweis
nach HOLST-JENSEN et al. (2003)

Das in die Pflanze eingeführte Genkonstrukt setzt sich aus verschiedenen Elementen zusammen. Es enthält mindestens das 'fremde' Strukturgen sowie einen Promotor und Terminator als regulatorische Sequenzen zum Start bzw. Abbruch der Transkription (HÖRTNER 1997).

PCR Systeme zum allgemeinen Nachweis transgener DNA werden als 'Screening-Assays' bezeichnet und sollen ein möglichst breites Spektrum von GVP detektieren. Ihre Zielsequenzen sind daher Promotoren, Terminatoren und Markergene, die für verschiedene Transformationslinien verwendet wurden.

Zum Nachweis der transgenen Eigenschaft werden PCR Assays mit der Zielsequenz des 'fremden' Strukturgens eingesetzt (Abbildung 4-1, GVO-Gen). Solche auf dem 'Fremdgen' basierenden PCR Assays sind spezifischer als Screening-Assays, haben aber noch ein relativ breites Detektionsspektrum. Meist wird zum Nachweis ein Primer in die Sequenz des 'fremden' Strukturgens und der andere Primer in eine angrenzende Sequenzregion platziert. So umspannen Konstrukt spezifische PCR Assays Übergangsregionen (vgl. Abbildung 4-1), womit eine starke Einschränkung fraglicher Genotypen erreicht wird.

Die bisher beschriebenen PCR Assays können jedoch nicht zur eindeutigen Identifizierung der Transformationslinie ('Event') verwendet werden. Diese höchste Spezifität vermittelt nur ein Event spezifischer PCR Assay, bei dem die Übergangsregion der transformierten Genkassette zur pflanzlichen DNA (host DNA) an der Insertionsstelle detektiert wird.

PCR-Referenzsysteme zum Nachweis pflanzlicher Strukturgene

PCR-Referenzsysteme werden in der GVP-Analyse zum Nachweis des Vorhandenseins bzw. der PCR-Fähigkeit pflanzlicher DNA mitgeführt, in Kombination mit Screening-, Fremdgen oder Konstrukt spezifischen PCR Assays (HÖRTNER 1997; MEYER 1999). Die Spezifität der Referenzsysteme variiert je nach Fragestellung vom allgemeinen Nachweis pflanzlicher DNA bis zur Bestimmung von Gattung oder Art. Als Referenzgene dienen meist 'house keeping' Gene, die in möglichst geringer Kopienzahl im Genom vorkommen. In Tabelle 4-1 sind die Referenzsysteme für die landwirtschaftlich bedeutendsten Kulturarten aufgeführt. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde ein *Brassica* spezifisches Referenzsystem zum Nachweis von Raps entwickelt.

Tabelle 4-1: Qualitative PCR Referenz Assays zum Nachweis pflanzlicher Strukturgene

Pflanzenart	Zielsequenz	Linie	Referenz
Eukaryotische DNA Assays			
<i>Lycopersicon esculentum</i>	18S-rDNA	Flavr Savr TM	MEYER 1995
<i>Glycine max</i>		RR-Soja	KÖPPEL et al. 1997; STRAUB et al. 1999
<i>Zea mays</i>		Bt176	MEYER 1995; HUPFER et al. 1997
<i>Triticum aestivum</i>		Nicht-GVP	ALLMANN et al. 1993; KÖPPEL et al. 1998
Pflanzliche DNA Assays			
<i>Beta vulgaris</i>	Plant-1/2	RR-Zuckerrübe	PIETSCH et al. 1997; KUMAR et al. 1998
<i>Brassica napus</i>		LL-Raps	WAIBLINGER et al. 1999
<i>Glycine max</i>		RR-Soja	PIETSCH et al. 1997
<i>Lycopersicon esculentum</i>		Flavr Savr TM	PIETSCH et al. 1997
<i>Oryza sativa</i>		nicht bekannt	TABERLET et al. 1991
<i>Solanum tuberosum</i>		PVY-Resistenz	PIETSCH et al. 1997
<i>Zea mays</i>		LL-Mais	WAIBLINGER et al. 1999
<i>Zea mays</i>	26s rRNA	Bt176	PETIT et al. 2003

Tabelle 4-1 (Fortsetzung): Qualitative PCR Referenz Assays zum Nachweis pflanzlicher Strukturgene

Pflanzenart	Zielsequenz	Linie	Referenz
Spezies spezifische DNA Assays			
<i>Zea mays</i>	ADH	Bt176	Van DUJN et al. 2002; PETIT et al. 2003
	Hm	Bt176	PAULI et al. 2001
		RR-Soja	VAÏTILINGOM et al. 1999; TERRY et al. 2002
	<i>Zein</i>	Bt176	STUDER et al. 1997; VAÏTILINGOM et al. 1999; HÜBNER et al. 2001; FERIOTTO et al. 2003
		Bt11, MON810 T25	HÜBNER et al. 2001
<i>Ivr</i>	Bt176	EHLERS et al. 1997; HUPFER et al. 1998, 2000; JANKIEWICZ et al. 1999; VOLLENHOFER et al. 1999; CHIUEH et al. 2001	
	Bt11, MON810 T25	CHIUEH et al. 2001	
<i>Brassica napus</i>	<i>S_GT</i>	Falcon GS40/90	DIESE ARBEIT
	<i>PEPC-3</i>	unbekannt	HELLEBRAND et al. 1998
<i>Glycine max</i>	<i>Lel</i>	RR-Soja	MEYER et al. 1996; PAULI et al. 1998; ZIMMERMANN et al. 1998b, STRAUB et al. 1999; VOLLENHOFER et al. 1999; WURZ et al. 1999; LIN et al. 2001; VAN DUJN et al. 2002; BAUER et al. 2003
<i>Triticum aestivum</i>	25/18s	unbekannt	ALLMANN et al. 1993
<i>Triticum durum</i>	LMW-Glutenin	Linie 1702	TERZI et al. 2003)
	Pur	unbekannt	ARLORIO et al. 2003
<i>Avena species</i>	5S-rDNA	Nicht-GVP	KÖPPEL et al. 1998

In der Real-Time PCR erfolgt über die Kopienzahl des Referenzgens die Bestimmung der eingesetzten Proben-DNA und eine Normalisierung der Transgenkopien. Eine exakte Kenntnis der Kopienzahl des Referenzgens pro Genomäquivalent (GÄ) und seiner Spezifität sind die Voraussetzungen, dass sich Anteile fremder Spezies nicht verfälschend auf die Quantifizierung des GVP-Anteils auswirken. Daher ist die Identifizierung geeigneter Referenzgene ein kritischer Punkt in der Entwicklung eines Real-Time PCR Nachweissystems. Zum Überblick wurden die Strukturgene, die sich als Referenzsysteme in der Real Time PCR-Analyse eignen, in Tabelle 4-2 zusammengestellt.

Im Hinblick auf die Saatgutanalyse wurde in dieser Arbeit ein Raps spezifisches Referenzgen in niedriger Kopienzahl gesucht. Dieses Referenzgen sollte über einen PCR-Nachweis auch bei den optisch kaum unterscheidbaren Samen der *Brassica*-Arten eine eindeutige Erkennung von Raps zulassen.

Einige Kandidatengene waren aufgrund hoher Kopienzahlen bzw. als Angehörige großer Genfamilien mit starken Sequenzhomologien nicht als Referenzgene geeignet (DE SILVA et al. 1990; LENMAN et al. 1993).

Tabelle 4-2: Quantitative Real-Time PCR Referenz Assays zum Nachweis pflanzlicher Strukturgene

Pflanzenart	Zielsequenz	Linie	Referenz
<i>Zea mays</i>	<i>Hm</i>	MON810 Bt176	ZIMMERMANN et al. 1998a PARDIGOL et al. 2003
	<i>Ivr</i>	Bt176, Bt11, MON810, T25 GA21	BRODMANN et al. 2002 (RØNNING et al. 2003) HERNANDEZ et al. 2004
	<i>Zein</i>	Bt176 MON810, Bt11, T25	HÖHNE et al. 2002; FERIOTTO et al. 2003 HÖHNE et al. 2002
	<i>ZSSIb</i>	Bt176, Bt11, GA 21, T25 MON810	KURIBARA et al. 2002 SHINDO et al. 2002
<i>Brassica napus</i>	<i>BnACCg8</i>	Topas 19/2, MS8xRF3	HERNANEDZ et al. 2001 HERNANEDZ et al. 2001
	<i>PEPC-3</i>	T45, Liberator Topas 19/2, Falcon GS40/90, GT73, GT200	ZEITLER et al. 2002
	<i>S_GT</i>	Falcon GS40/90	BLOCK und SCHWARZ 2003, DIESE ARBEIT
<i>Glycine max</i>	<i>Lectin 1</i>	30-3-2	KÖPPEL et al. 1997; WURZ et al. 1999; BERDAL und HOLST-JENSEN 2001; HÜBNER et al. 2001; PAULI et al. 2001; SCHMIDT und PARROTT 2001; TAVERNIERS et al. 2001; TERRY und HARRIS 2001; WAIBLINGER et al. 2001; SHINDO et al. 2002; TERRY et al. 2002; HIRD et al. 2003; PARDIGOL et al. 2003

Zwei Gene, die für die Phosphoenolpyruvat Carboxylase (PEPC-3) bzw. die S-Glucosyltransferase (S_GT) von *B. napus* kodieren, entsprachen den theoretischen Anforderungen. Die Schätzung der Genkopienzahl mit der RFLP-Analyse ergab je nach Restriktionsenzym 3-9 Kopien des *pepc3*- bzw. 2-6 Kopien des *s_gt*-Amplikons im Raps genom. Da bekannt ist, dass RFLP-Sonden auch an Zielsequenzen mit weniger als 100% Homologie binden, erlaubt diese Hybridisierungstechnik nur eine ungefähre Schätzung der Genkopienzahl.

Pseudogene, Gene großer Genfamilien und Gene von Isoenzymen können durch homologe Sequenzbereiche zur Überschätzung der Kopienzahl via RFLP-Technik führen. Dies bestätigte die Schätzung der *s_gt*-Kopienzahl mit plasmidalen Standards, die nur zwei Kopien pro

haploidem Genom für Raps ergab. Mit zwei Kopien pro GÄ hatte das *s_gt*-Gen ideale Voraussetzungen für die Entwicklung eines Real-Time PCR Assays.

Die Evaluierung der Spezifität zeigte, dass weder der qualitative noch der quantitative PCR Assay des *pepc3*-Gens spezifisch für Raps sind. Beide erzeugten auch für andere *Brassica*-Arten PCR-Produkte. Der 'unruhige' Kurvenverlauf des *pepc3*-Gen spezifischen Real-Time PCR Assays über alle Stufen der LL-Verdünnungsreihen (vgl. Abbildung 3-2) könnte auf die drei Punktmutationen zurückzuführen sein, die im Rahmen dieser Arbeit jeweils innerhalb der Sonden- und Primerregionen aufgedeckt worden sind. Auch die *s_gt*-Strukturgen PCR Assays zeigten keine Spezifität für *B. napus*, sondern detektierten ebenso andere *Brassica*-Arten. Wahrscheinlich liegt eine der zwei *s_gt*-Genkopien pro GÄ auf dem A-Genom (Raps, Rüb- sen, autosyndetische Chromosomenpaare im Ölrettich) und eine auf dem C-Genom (Kohl- arten). Da auch Gelbsenf mit dem *s_gt*-PCR Assay nachgewiesen wurde, besitzt möglicher- weise auch das B-Genom eine *s_gt*-Kopie (MITUSHIMA, 1980).

Aufgrund der Verwandtschaftsverhältnisse ist die Wahrscheinlichkeit von Sequenzwieder- holungen und -homologien bei Raps besonders hoch. Als amphidiploider Arthybride ($x = 19$) besitzt *B. napus* Gene des A-Genoms ($x = 9$) von *B. rapa* und des C-Genoms von *B. oleracea* ($x = 10$) (U, 1934). Es sind jedoch noch weitere homöologe Chromosomen zu erwarten. Denn nach MITUSHIMA (1980) sind alle heutigen *Brassica*-Genome sekundär balancierte Polyploide eines tetraploiden Vorfahren mit $x = 6$, denen evolutionär einzelne Chromosomenpaare verlo- ren gingen. Homöolge Chromosomen treten demnach auch zwischen verschiedenen *Brassica*- Arten auf und sind wahrscheinlich eine Ursache für die Schwierigkeiten beim Erstellen eines selektiven PCR Assays für *B. napus*.

Ein Vergleich der beiden Real-Time PCR Referenz Assays *pepc3*-TM und *s_gt*-TM mit den selben Kalibrierstandards ergab, dass der *s_gt*-TM der effizientere und robustere Real-Time PCR Assay ist (vgl. Ergebnisse 3.1.1). Dies konnte durch die hohen Wiederfindungsraten des *s_gt*-TM Assays mit verschiedenen Kalibrierstandards bestätigt werden (BLOCK und SCHWARZ 2003).

PCR Systeme zum allgemeinen Nachweis transgener DNA

Der Großteil aller GVP beinhaltet Konstrukte, die entweder den Promotor (P-35S) oder den Terminator (T-35S) des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) enthalten. Häufig wurde auch der Nopalinsynthase-Gen Terminator (T-NOS) von *Agrobacterium tumefaciens* zur Konstruktherstellung genutzt (STUDER et al. 1997). Als Vektoren sind pBR322 und dessen Abkömmlinge weit verbreitet. Sie kodieren Markergene für eine Ampicilin- (*ampR*) oder Neomycin/Kanamycin-Resistenz (*nptII*). HEMMER und PAULI (1998) berichten, dass im Jahr 1998 noch ca. 60% der GVP die *nptII*-Resistenz enthielten, so dass qualitative PCR-Nachweismethoden, die auf dem *nptII*-Gen beruhen, ein breites Applikationsfeld besitzen (Tabelle 4-4).

Tabelle 4-3: Vorkommen und Häufigkeit von Promotor-, Terminator- und Markersequenzen in GVP

Genotyp	P-35S	T-35S	T-NOS	<i>nptII</i>	Literaturquelle
Transgener Mais					
Bt176	1	3	-	-	MATSUOKA et al. 2002
Bt11	2	-	2	-	MATSUOKA et al. 2002
MON810	1	-	-	-	MATSUOKA et al. 2002
MON802	3	-	3	+	MATSUOKA et al. 2002
DLL25	1	-	-	-	MATSUOKA et al. 2002
T25	1	1	-	-	MATSUOKA et al. 2002
GA21	-	-	3	-	HERNANDEZ et al. 2004
CBH-351	≥ 4	-	≥ 4	-	WINDELS et al. 2003
Transgener Soja					
RR-Soja	+	-	+	-	WINDELS et al. 2001
Transgene Zuckerrübe					
T120-7	1	1		1	GEN-ETHISCHES NETZWERK 1999
Transgener Raps					
GT73	-	-	-	-	RKI 2001

MATSUOKA und Mitarbeiter (2002) sequenzierten transgene Maislinien, wobei sie feststellten, dass von sieben Linien sechs (Bt176, Bt11, MON810, MON802, DLL25 und T25) den P-35S beinhalten. Lediglich der RR-Mais GA21 besaß eine andere Promotorsequenz. Der ebenfalls häufige T-NOS kam dagegen nur in drei, der T-35S in zwei Linien vor (Tabelle 4-3). Die wichtigsten Zielsequenzen für PCR-Screening Assays sowie ihre ins pflanzliche Genom integrierten Kopienzahlen wurden in Tabelle 4-3 zusammengestellt.

Tabelle 4-4: Qualitative PCR-Screening Assays für den Nachweis von GVP-Regulations- bzw. Markersequenzen

Zielsequenz	Pflanzenart	Linien	Referenz
P-35S	<i>Beta vulgaris</i>	LL-Zuckerrübe	PIETSCH et al. 1997
	<i>Brassica napus</i>	LL-Raps	ANONYMOUS 1998
	<i>Glycine max</i>	RR-Soja	BRODMANN et al. 1997; SHIRAI et al. 1998; HARDEGGER et al. 1999; HURST et al. 1999; LIPP et al. 1999; HÜBNER et al. 2001; LIN et al. 2001; PAULI et al. 2001; MATSUOKA et al. 2002
		LL-Soja	ANONYMOUS 1998
	<i>Gossypium hirsutum</i>	RR-Baumwolle	ANONYMOUS 1998
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Flavr Savr™	PIETSCH et al. 1997; ANONYMOUS 1998
	<i>Zea mays</i>	Basta-Mais Bt176	PIETSCH et al. 1997
BRODMANN und NICHOLAS 1999; LIPP et al. 1999, 2001; VOLLENHOFER et al. 1999; PAULI et al. 2001			
Bt11 T25		BRODMANN und NICHOLAS 1999 ANONYMOUS 1998; BRODMANN und NICHOLAS 1999; MATSUOKA et al. 2002	
MON810		BRODMANN und NICHOLAS 1999; MATSUOKA et al. 2002; PARDIGOL et al.	
	MON802, DLL25	MATSUOKA et al. 2002	
T-35S	<i>Zea mays</i>	Bt176, T25	MATSUOKA et al. 2002
<i>nptII</i>	<i>Zea mays</i>	MON802	MATSUOKA et al. 2002
Tn5 <i>nptII</i>	<i>Beta vulgaris</i>	LL-Zuckerrübe	PIETSCH et al. 1997
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Flavr Savr™	MEYER 1995; PIETSCH et al. 1997
<i>ampR / bla</i>	<i>Zea mays</i>	Bt176	EHLERS et al. 1997
T-NOS	<i>Gossypium hirsutum</i>	RR-Baumwolle	ANONYMOUS 1998
	<i>Glycine max</i>	RR-Soja	BRODMANN et al. 1997; SHIRAI et al. 1998; HARDEGGER et al. 1999; LIPP et al. 1999; VOLLENHOFER et al. 1999; LIN et al. 2001; PERMINGEAT et al. 2002
		LL-Soja	ANONYMOUS 1998
	<i>Solanum tuberosum</i>	B33-Invertase	PIETSCH et al. 1997
	<i>Zea mays</i>	Bt11, GA21	MATSUOKA et al. 2002
LL-Mais		ANONYMOUS 1998	
MON802		MATSUOKA et al. 2002	

Eine Zusammenstellung qualitativer und quantitativer PCR-Screening Assays zeigen Tabelle 4-4 und 4-5. Für eine quantitative Analyse sind Screening Assays, die auf regulatorischen Sequenzen beruhen, nur sinnvoll, wenn die integrierte Kopienzahl pro GÄ bekannt ist und keine Mischprobe von verschiedenen Transgenen vorliegt. Einige Transformationsereignisse tragen mehrere Konstrukte, so dass regulatorische Sequenzen wiederholt vorkommen können (vgl. Tabelle 4-3). Werden diese Sequenzwiederholungen in der Auswertung von Real Time PCR-Screening Assays nicht berücksichtigt, kann das Quantifizierungsergebnis erheblich verfälscht werden.

Da der P-35S in die LL-Linie 'Falcon GS40/90' integriert ist, die innerhalb des Freisetzungsversuches dieses Projektes angebaut wurde, diente sie als Zielsequenz für die Etablierung von PCR-Nachweisverfahren. Ein Sensitivitätstest der beiden qualitativen und quantitativen P-35S Screening Assays zum allgemeinen PCR-Nachweis transgener DNA-Sequenzen (HURST et al. 1999) ergab für beide eine Empfindlichkeit gegenüber den LL-Linien 'T25' (Mais), 'Falcon GS40/90' (Raps) und 'T120-7' (Zuckerrübe). Die Bt-Maislinien Bt176 und MON810 waren ebenfalls über den P-35S detektierbar, was den Angaben der Literatur entspricht (Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5: Quantitative PCR-Screening Assays für den Nachweis von GVP-Regulations- bzw. Markersequenzen

Zielsequenz	Pflanzenart	Linien	Referenz
P-35S	<i>Zea mays</i>	Bt11	BRODMANN und NICHOLAS 1999; HÖHNE et al. 2002
		Bt176	BRODMANN und NICHOLAS 1999; PARDIGOL et al. 2003)
		MON810	BRODMANN und NICHOLAS 1999; HÖHNE et al. 2002
		T25	BRODMANN und NICHOLAS 1999; HÖHNE et al. 2002
	<i>Glycine max</i>	RR-Soja	PAULI et al. 2001; TERRY et al. 2002; PARDIGOL et al. 2003
T-NOS	<i>Glycine max</i>	RR-Soja	PERMINGEAT et al. 2002
	<i>Zea mays</i>	GA 21	
<i>hph</i>	<i>Glycine max</i>	Bt-Soja	SCHMIDT und PARROTT 2001
	<i>Arachis hypogaea L.</i>	T1 peanut	

Die Sequenzierung des Amplikons der qualitativen Primer für den P-35S aus LL-Mais 'T25' sowie der Bt-Maissorten MON810 und Bt176 ergab eine 100%ige Übereinstimmung der Genotypen in einem Bereich von 150 bp. LL-Raps 'Falcon GS40/90' zeigte aufgrund einer Deletion von drei Nukleotiden nur eine 98%ige Übereinstimmung mit den anderen Genotypen. Gegenüber der theoretischen 35S-Promotorsequenz der EMBL-Datenbank (A18053) wiesen alle vier Genotypen eine Punktmutation von C nach T an Position 155 auf. Die Ergebnisse sind 100%ig identisch mit den Sequenzierungen von MATSUOKA et al. (2002) für die 35S-Promotorregion von Bt176, MON810 und T25. Da sich unbekannte Punktmutationen auf die Funktion eines Real-Time PCR Assays auswirken können (vgl. *pepc3*-Gen spezifischer Real-Time PCR Assay), bestätigen diese Ergebnisse die Notwendigkeit exakter Sequenzanalysen.

Durch den breiten Einsatz weniger regulatorischer Sequenzen und Selektionsmarker in verschiedene Genotypen (YODER und GOLDSBROUGH 1994) wurde die Entwicklung allgemeiner PCR-Nachweisverfahren erst möglich. Aufgrund der häufigen Verwendung erlauben diese Sequenzen jedoch keine Unterscheidung zugelassener und nicht zugelassener GVP. Deshalb werden sie bei einer evtl. Mischung solcher GVP-Linien nicht eingesetzt (MEYER 1999). Die anfänglich in der GVP-Entwicklung häufig verwendeten, von Mikroorganismen abgeleiteten regulatorischen Sequenzen bereiten als Zielgene für PCR-Screening Assays ebenfalls Probleme. Bei diesen Zielgenen kann eine mikrobielle Kontamination zu falsch-positiven PCR-Ergebnissen führen (MEYER 1999; ANONYMUS 2001).

Durch einen zunehmenden Ersatz allgemeiner Regulationssequenzen wird die Erstellung von PCR-Screening Assays in Zukunft erschwert. Für diese Entwicklung gibt es verschiedene Gründe. Die bisher für GVP-Linien häufig eingesetzten mikrobiellen Sequenzmotive erfahren vor allem wegen ihrer mutmaßlichen Erleichterung des horizontalen Gentransfers einen Rückgang (INSTITUTE OF SCIENCE IN SOCIETY 2000). Für CaMV-Sequenzen wurden bereits Rekombinationen zwischen verschiedenen GVP bzw. zwischen integrierten und natürlichen Virussequenzen beschrieben (GAL et al. 1991, WINTERMANTEL und SCHOELZ 1996). Eine Ursache hierfür ist das reaktive Zentrum ('hotspot') des P-35S, das nach KOHLI et al. (1999) eine erhöhte Rekombinationshäufigkeit bedingt. So konnten durch Rekombinationen mit transgenen P-35S sogar dormante Viren reaktiviert werden (HO et al. 1999).

Speziell für die *Brassicaceae* wird der Einsatz des P-35S wahrscheinlich zurückgehen, da die P-35S Sequenz von dem CaMV, einem Pathogen dieser Pflanzenfamilie, abgeleitet wurde. Von fälschlich erhöhten Transgenanteilen aufgrund einer CaMV-Infektion wurde bereits von WOLF et al. (2000) berichtet. Je nach Saison bedingter Intensität einer CaMV-Infektion (RAYBOULD et al. 1999) kann sogar die Genexpression durch transkriptionales und posttranskriptionales 'gene silencing' gestört werden (AL-KAFF et al. 2000).

Im Bereich regulatorischer GVP-Sequenzen besteht eine deutliche Tendenz, konstitutive Promotoren durch spezifische zu ersetzen. Bei landwirtschaftlichen Kulturen gewinnen vor allem Samen spezifische Promotoren an Bedeutung. Für die wichtigen Kulturarten Reis (LEE et al. 2001), Mais (CHIKWAMBA et al. 2002; SUNILKUMAR et al. 2002), Baumwolle (TOWNSEND und LLEWELLYN 2002), Flachs, Raps (DREXLER et al. 2003) und Durumweizen (TERZI et al. 2003) stehen Samen spezifische Promotoren bereits zur Verfügung. Bei der Kartoffel erfolgte entsprechend die Einführung eines Knollen spezifischen Promotors (HASSAN-HAUSER et al. 1998). Mit Hilfe des Tapetum spezifischen Promotors TA29 konnte GV-Raps eine männliche Sterilität vermittelt werden, die in der Hybridzüchtung genutzt wird (MARIANI et al. 1990).

Eine Wandlung im Einsatz transgener Sequenzen findet sich auch im Bereich Selektionsmarker. Antibiotika-Resistenzgene sollen in Zukunft durch den Einsatz von markerfreien Transformationssystemen ersetzt werden (YODER und GOLDSBROUGH 1994; BRANDT 2000; IAMTHAM und DAY 2000; COUNCIL 2001). Analog zu den Regulationssequenzen mikrobiellen Ursprungs wird bei den Antibiotika-Resistenzgenen ebenfalls ein horizontaler Gentransfer auf Bakterien mit ähnlichen Sequenzmotiven befürchtet (BRYANT und LEATHER 1992; MITCHELL und BRADBURY 1999). Für das häufig verwendete *nptII*-Gen wurde von TEPFER et al. (2003) ein Homologie abhängiger DNA-Transfer einer GVP-Linie auf das Bodenbakterium *Acinetobacter* nachgewiesen. Ob dieser Transfer des *nptII*-Gens gefährlich ist, wird allerdings kontrovers diskutiert. So halten FLAVELL und Mitarbeiter (1992) die Verwendung des *nptII*-Gens in GVP für gefahrlos, da das Gen ohnedies bereits ubiquitär vorhanden sei und das Genprodukt Mensch und Tier nicht schade.

Verschiedene Arbeitsgruppen (BRÄUTINGAM et al. 1997; ZENZ et al. 1998 BAUER et al. 1999) wiesen bereits einen Gentransfer von Nahrungsmitteln auf Mikroorganismen nach. In einem Fall wurde selbst die Transformation von Bakterien des menschlichen Gastrointestinaltrakts mit dem *epsps*-Gens beschrieben (NETHERWOOD et al. 1999). Aufgrund solcher sehr seltenen Ereignisse befürchten einige Autoren durch den Einsatz bakterieller und viraler Sequenzmotive eine Transformation harmloser, aber häufig vorkommender Mikroorganismen mit Resistenzgenen. Als Folge dieser Vorbehalte dürfen nach der neuen EU-Freisetzung-Richtlinie 2001/18/EG ab dem Jahr 2005 keine GVP mehr in Verkehr gebracht werden, wenn die als Marker verwendeten Antibiotikaresistenzgene eine 'schädliche Auswirkung auf die menschliche Gesundheit oder Umwelt haben können'. Für Freisetzungsversuche gilt diese Frist bis Ende 2008 (BIO SICHERHEIT 2002). Strategien zur postintegralen Eliminierung der Selektionsmarker sind von HOHN et al. (2001) beschrieben. Von KUNZE et al. (2001) wurden bereits antibiotikafreie Marker, die auf metabolischen Fähigkeiten beruhen, entwickelt. Auch nicht-toxische Selektionsmarker, die auf einer Verwertung der Zucker Mannose und Xylose im Nährmedium beruhen, stehen bereits zur Verfügung (BOJSEN et al. 1993; HALDRUP et al. 1998).

PCR Systeme zum Nachweis transgener Fremdgene

In den letzten Jahren wurden einige PCR Assays zum Nachweis transgener Strukturgene entwickelt. Sie betreffen vor allem die landwirtschaftlichen Kulturen Soja und Mais. Die wichtigsten qualitativen und quantitativen PCR Assays zum Nachweis transgener Fremdgene sind in Tabelle 4-6 und Tabelle 4-7 zusammengestellt.

Tabelle 4-6: Qualitative PCR Assays zum Nachweis transgener Fremdgene

Zielsequenz	Pflanzenart	Linie	Referenz
<i>bar</i>	<i>Zea mays</i>	Bt176 DLL25; T25	EHLERS et al. 1997 MATSUOKA et al. 2002
<i>cryIA(b)</i>	<i>Zea mays</i>	Bt176 Bt11 MON802, MON810	EHLERS et al. 1997; STUDER et al. 1998; VOLLENHOFER et al. 1999; HURST et al. 1999; LIN et al. 2000; HÜBNER et al. 2001; BAUER et al. 2003; FERIOTTO et al. 2003 PERMINGEAT et al. 2002 MATSUOKA et al. 2002
<i>cry9c</i>	<i>Zea mays</i>	CBH-351	WINDELS et al. 2003
<i>epsps</i>	<i>Zea mays</i> <i>Glycine max</i>	RR-Mais MON802 RR-Soja	PERMINGEAT et al. 2002 MATSUOKA et al. 2002 BRODMANN et al. 1997; WURZ et al. 1999; LIN et al. 2001; PAULI et al. 2001; PERMINGEAT et al. 2002; BAUER et al. 2003
<i>m-epsps</i>	<i>Zea mays</i>	GA21	MATSUOKA et al. 2002
<i>gox</i>	<i>Zea mays</i>	MON802	MATSUOKA et al. 2002
<i>pat</i>	<i>Zea mays</i>	Bt11	PERMINGEAT et al. 2002

Zur Klärung der Spezifität des innerhalb dieser Arbeit entwickelten qualitativen *pat*-Strukturgen PCR Assays wurden verschiedene Transgenlinien in der PCR getestet. Die LL-Linien von Raps 'Falcon GS40/90', Mais 'T25' und Zuckerrübe 'T120-7', die nicht auf denselben Transformationsvektor zurück gehen, jedoch alle von der Bayer CropScience AG entwickelt wurden, konnten ausnahmslos nachgewiesen werden.

Tabelle 4-7: Quantitative PCR Assays zum Nachweis transgener Fremdgene

Zielsequenz	Pflanzenart	Linie	Referenz
<i>CP4-epsps</i>	<i>Glycine max</i>	RR-Soja. GT73, GT200	HIRD et al. 2003 ZEITLER et al. 2002
<i>CryIA</i>	<i>Zea mays</i>	Bt176	FERIOTTO et al. 2003
<i>CryIA(c)</i>	<i>Glycine max</i>	Bt-Soja	SCHMIDT und PARROTT 2001
<i>pat</i>	<i>Brassica napus</i>	T45, Topas 19-2, Falcon GS40/90, Liberator	ZEITLER et al. 2002

Auf die Herstellung eines Real-Time PCR Assays zum Nachweis des *pat*-Gens wurde zugunsten eines Konstrukt spezifischen Real-Time PCR Assays mit höherer Spezifität verzichtet (vgl. 3.1.4).

Fremde Strukturgene erfahren vor der Transformation meist eine gravierende Veränderung der Nukleinsäuresequenz, um sie der optimalen Kodonerkennung der entsprechenden Spezies anzupassen. So haben Strukturgen spezifische PCR Assays gegenüber Screening Assays den Vorteil, dass die Wahrscheinlichkeit Falschpositiver durch mikrobielle Kontamination der Donatoren transgener Sequenzen wesentlich geringer ist. Für die neu entwickelten transgenen Eigenschaften, die bereits auf dem Weltmarkt gehandelt werden, in der EU aber noch nicht zugelassen sind, werden weitere Fremdgen spezifische Nachweissysteme benötigt.

PCR Systeme zum Nachweis transgener DNA-Konstrukte

PCR Assays, die eine Übergangsregion benachbarter Sequenzmotive innerhalb eines transgenen Konstruktes umfassen, werden Konstrukt spezifisch genannt und besitzen eine hohe Spezifität (Abbildung 4-1). Qualitative und quantitative PCR Assays zum Nachweis transgener GVP-Konstrukte wurden in Tabelle 4-8 und 4-9 aufgeführt.

Der in dieser Arbeit entwickelte Konstrukt spezifische PCR Assay ist allerdings nicht nur für einen einzigen Transformationsvektor sensitiv. Obwohl zur Transformation der GVP-Linien 'GS40/90' (Vektor pHoe6/Ac), 'T25' (verändertes pUC18-Plasmid) und 'T120-7' (pOCA18/AC) nicht derselbe Vektor eingesetzt wurde, war ihre Sequenz soweit identisch, dass sie PCR-Produkte gleicher Größe lieferten. Da alle drei LL-Linien von Bayer CropScience AG entwickelt worden waren, lässt die Homologie auf eine starke Ähnlichkeit der Vektoren in Bezug auf Sequenzbausteine und ihre Abfolge schließen.

Tabelle 4-8: Qualitative PCR Assays für den Konstrukt spezifischen GVP-Nachweis

Zielsequenz	Pflanzenart	Linien	Referenz
P-35S/ <i>nptII</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	unbekannt	WIDMER et al. 1997
	<i>Brassica napus</i>	Laurat	LAG 2001
B33/ <i>gbss</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Ristica, Desiree	HASSAN-HAUSER et al. 1998
P-35S/ FS	<i>Lycopersicon escul.</i>	Flavr Savr	MEYER 1995
P-35S/ <i>bar</i>	<i>Zea mays</i>	Bt 176	EHLERS et al. 1997; VAN DUIJN et al. 2002
Glu-1D-1/ <i>rab1</i>	<i>Triticum durum</i>	Bt 11	LAG 2001
P-SsuAra/ <i>bar</i>	<i>Brassica napus</i>	MS8/RF3	LAG 2001
P-35S/ <i>pat</i>	<i>Beta vulgaris</i>	T120-7	WAIBLINGER et al. 1999; LAG 2001; BLOCK und SCHWARZ 2003
	<i>Brassica napus</i>	Falcon GS40/90	WAIBLINGER et al. 1999; LAG 2001; BLOCK und SCHWARZ 2003
		Topas 19/2	LAG 2001

Tabelle 4-8 (Fortsetzung): Qualitative PCR Assays für den Konstrukt spezifischen GVP-Nachweis

Zielsequenz	Pflanzenart	Linien	Referenz
P-35S/ <i>pat</i>	<i>Zea mays</i>	LH82 T25 T14	WAIBLINGER et al. 1999 LAG 2001; BLOCK und SCHWARZ 2003 LAG 2001
CDPK/ <i>CryIA(b)</i>	<i>Zea mays</i>	Bt 176	JANKIEWICZ et al. 1999; HUPFER et al. 1999, 2000; LIN et al. 2000; CHIUEH et al. 2001; HÜBNER et al. 2001; PETIT et al. 2003
<i>Hsp70/ CryIA(b)</i>	<i>Zea mays</i>	MON810	CHIUEH et al. 2001
<i>Ivs6/ CryIA(b)</i>	<i>Zea mays</i>	Bt 11	CHIUEH et al. 2001
P-35S/ <i>Hsp70</i>	<i>Zea mays</i>	MON810	ZIMMERMANN et al. 1998a
P-35S/CTP	<i>Glycine max</i>	30-3-2	WURZ UND WILLMUND 1997; VAN HOEF et al. 1998; HURST et al. 1999; JANKIEWICZ et al. 1999; STRAUB et al. 1999; VOLLENHOFER et al. 1999
CTP/ <i>epsps</i>	<i>Glycine max</i>	30-3-2	KÖPPEL et al. 1997; STUDER et al. 1998
CP4- <i>epsps/ T-NOS</i>	<i>Glycine max</i>	30-3-2	VAN DUIJN et al. 1997
P-35S/ <i>epsps</i>	<i>Glycine max</i>	30-3-2	KÖPPEL et al. 1997; HURST et al. 1999; WAIBLINGER et al. 2001

Um die transgene Linie identifizieren zu können, kann zusätzlich eine Sortendifferenzierung mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern erfolgen. Aufgrund der kodominanten Vererbung können Mikrosatellitenmarker auch zur Unterscheidung von homo- und heterozygoten Genotypen herangezogen werden. Damit wäre eine Auskreuzung des Transgens nach dem Verursacherprinzip eindeutig rückverfolgbar.

Tabelle 4-9: Quantitative PCR Assays für den Konstrukt spezifischen GVP-Nachweis

Zielsequenz	Pflanzenart	Linien	Referenz
<i>CryIA(b)/ PEPC-I9</i>	<i>Zea mays</i>	Bt176	KURIBARA et al. 2002; SHINDO et al. 2002
P-PEP-C/ <i>CryIA(b)</i>	<i>Zea mays</i>	Bt176	BRODMANN et al. 2002
IVS6/ <i>CryIA(b)</i>	<i>Zea mays</i>	Bt11	KURIBARA et al. 2002; SHINDO et al. 2002
P-35S/ <i>Ivs2</i>	<i>Zea mays</i>	Bt11	BRODMANN et al. 2002
<i>Hsp70/ CryIA(b)</i>	<i>Zea mays</i>	bt MON810	KURIBARA et al. 2002; SHINDO et al. 2002
P-35S/ <i>hsp70</i>	<i>Zea mays</i>	bt MON810	BRODMANN et al. 2002
OTP/T-35S	<i>Zea mays</i>	RR GA21	KURIBARA et al. 2002; SHINDO et al. 2002
Vector/ P-r-act	<i>Zea mays</i>	RR GA21	HERNANDEZ et al. 2004
<i>Pat/ T-35S</i>	<i>Zea mays</i>	T25	KURIBARA et al. 2002; SHINDO et al. 2002
P-35S/ <i>pat</i>	<i>Zea mays</i>	T25	BRODMANN et al. 2002; DIESE ARBEIT
	<i>Brassica napus</i>	Falcon	DIESE ARBEIT
	<i>Beta vulgaris</i>	T120-7	DIESE ARBEIT
P-35S/ CTP	<i>Glycine max</i>	RR-Soja	PARDIGOL et al. 2003
CTP/ <i>epsps</i>	<i>Glycine max</i>	RR-Soja	KURIBARA et al. 2002; SHINDO et al. 2002

PCR Systeme zum spezifischen Nachweis der GVP-Linie

Die höchste Spezifität eines GVP-Nachweissystems besitzt ein Event spezifischer PCR Assay, dessen Zielsequenz die Integrationsstelle des transgenen Konstruktes im pflanzlichen Genom darstellt. Heutige Transformationsmethoden, ob direkte oder mit der Genföhre *Agrobacterium* vermittelte, verursachen eine randomisierte Integration dieser Genkassetten ins pflanzliche Genom. Dabei ist die Übergangsregion des integrierten Konstruktes zur DNA der Empfängerpflanze einzigartig für jedes Transformationsereignis.

Prozesse, die zu tandemartigen Wiederholungen transgener Sequenzen, zur Einfügung pflanzlicher DNA-Stücke in das Konstrukt, oder zur Neuorganisation des Konstruktes führen, werden durch Event spezifische PCR Assays erfasst (KOHLI et al. 1998; PAWLOWSKI und SOMERS 1998; WINDELS et al. 2001). So wiesen die Arbeitsgruppen von HERNÁNDEZ (2003) und MATSUOKA (2002) für die Maislinie YieldGard[®] (MON810) den Verlust einiger Sequenzbereiche des transgenen Konstruktes sowie des T-NOS nach. Für die Maislinie GA21 belegten HERNÁNDEZ et al. (2004) eine tandemartige Wiederholung des transgenen Konstruktes.

Nur ein Event spezifischer PCR Assay kann ohne zusätzliche Analysen klären, um welche Transformante es sich handelt, wenn die Transformation zweier Sorten derselben Spezies mit demselben Vektor erfolgte. Der Vektor pHoe6/Ac wurde beispielsweise zur Transformation der Rapssorten 'Liberator 8/92-1' und 'Falcon GS40/90' verwendet und die LL-Maislinien 'T25' und 'T14' (Bayer CropScience AG) besitzen ebenfalls den denselben Vektor. Im Gegensatz zum Konstrukt spezifischen PCR Assay erlaubt ein Event spezifischer die Unterscheidung dieser transgenen Linien ohne zusätzliche Sortendifferenzierung.

Ein Event spezifischer Assay bietet gegenüber anderen Assays auch im Format des Real-Time PCR Assays Vorteile bei der Quantifizierung von GVP-Anteilen. Denn selbst wenn eine GVP-Linie mehrere Konstrukte integriert hat, wird mit diesem PCR Assay nur eines detektiert, womit es nicht zu einer 'falschen' Erhöhung des Transgenanteils kommt. So diskutieren die EU-Mitgliedstaaten die Einführung eines verbesserten GVO-Identifikationssystems, das auf dem Nachweis von Transformationsereignissen (Events) beruht (HASLBERGER 2000). Problematisch ist der Event spezifische PCR-Nachweis von Nachkommen einer GVP-Linie, deren Konstrukte auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert waren. In der Meiose der GVP-Mutterlinie erfolgt dann eine freie Verteilung der Konstrukte an die Eizellen (BRYANT und LEATHER 1992). Nachgewiesen werden jedoch nur die Nachkommen, die dieses spezifische Transformationsereignis erhalten haben, andere Events sind mit dem Assay nicht detektierbar.

Vor der Entwicklung eines Event spezifischen PCR Assays muss die Sequenz der Integrationsstelle ins pflanzliche Genom bestimmt werden, wie von HARTL und OCHMAN (1996) sowie der Arbeitsgruppe von SPERTINI (1999) beschrieben. Dies erhöht den Aufwand für eine Erstellung und Optimierung außerordentlich, so dass bisher nur wenige Event spezifische Assays entwickelt worden sind (Tabelle 4-10 und Tabelle 4-11).

Tabelle 4-10: Qualitative PCR Assays für den Event spezifischen GVP-Nachweis

Zielsequenz	Übergangsregion	Linien	Referenz
5'-Mais/ Bt11-3'	<i>Zea mays</i> / Bt11	Bt11	ZIMMERMANN et al. 2000
5'-Mais/ CBH-351-3'	Chloroplast / T-NOS	CHB-351	LAG 2001; ANONYMUS 2001
5'-Mais/ MON810-3'	<i>Zea mays</i> / MON810	MON810	LAG 2001; ANONYMUS 2001
5'- RR/ Soja-3'	<i>Glycine max</i> / T-NOS	GTS 40-3-2	BERDAL und HOLST-JENSEN 2001; TAVERNIERS et al. 2001
5- Soja/ RR-3'	<i>Glycine max</i> / P-35S	GTS 40-3-2	TAVERNIERS et al. 2001

In Zukunft werden GVP-Linien mit physiologischen Eigenschaften ausgestattet sein, die ihnen das Überleben unter ungünstigen Umweltbedingungen erleichtern (LIN et al. 2000). Auch die Herstellung 'funktionaler Lebensmittel' mit neuer Inhaltsstoffzusammensetzung gehört nach BRANDT (2000) zur Produktpalette zukünftiger GVP. Bei dieser Vielfalt würde die Bereitstellung Event spezifischer PCR Assays für jede einzelne Transformante einen enormen Entwicklungsaufwand bedeuten.

Tabelle 4-11: Quantitative PCR Assays für den Event spezifischen GVP-Nachweis

Zielsequenz	Übergangsregion	Linien	Referenz
5'-Bt11/ Mais-3'	<i>Zea mays</i> / Bt11	Bt11	RØNNING et al. 2003
5'-Mais/ MON810-3'	<i>Zea mays</i> / P-35S	MON810	HOLCK et al. 2002
3'-Mais/ MON810-5'	<i>Zea mays</i> / CryIA(b)	MON810	HERNANDEZ et al. 2003
3'-Soja/ RR-3'	<i>Glycine max</i> / T-NOS	GTS 40-3-2	BERDAL und HOLST-JENSEN 2001
5'- RR/ Soja-3'	<i>Glycine max</i> / P-35S	GTS 40-3-2	TAVERNIERS et al. 2001

In dieser Arbeit wurde auf einen Event spezifischen PCR Assay zu Gunsten eines Konstrukt spezifischen verzichtet, der eine breitere Anwendung auf verschiedene LL-Arten ermöglicht. Durch geschickte Kombination Konstrukt spezifischer PCR Assays mit Spezies- bzw. Sorten spezifischen molekularen Markern können Event spezifische PCR Assays kostengünstig ersetzt werden.

Der vorherige Abschnitt zeigt, dass bereits eine Vielfalt verschiedener PCR Assays zum Nachweis transgener Pflanzen entwickelt wurde, die sich aufgrund ihrer Zielsequenz im Genom der GVP in ihrer Spezifität unterscheiden.

In der heutigen Diskussion um GVP-Schwellenwerte bieten Konstrukt spezifische Real-Time PCR Assays besondere Vorteile, da sie aufgrund ihrer hohen Spezifität robuste Quantifizierungsergebnisse liefern. Zum einen wird durch die Positionierung der Zielsequenz im Übergangsbereich zweier DNA-Sequenzen ein falschpositiver Nachweis von Mikroorganismen, als Donatoren transgener Sequenzmotive effektiv ausgeschlossen. Zum anderen erlauben sie durch die selektive Detektion eines speziellen DNA-Konstruktes eine quantitative Gleichbewertung von GVP mit einer bzw. verschiedenen Genkassetten. Dabei ist ihre Spezifität so hoch, dass sie meistens eine starke Einschränkung infrage kommender GVP-Linien zulassen. Doch obwohl auf dem Weltmarkt bereits eine gewisse Anzahl *pat*-transgener Rapslinien gehandelt werden ('Falcon GS40/90', 'Liberator 6/Ac', 'T45', 'Topas 19-2'; LAG 2003), die bislang keine EU-Marktzulassung erhielten, stand den Überwachungsbehörden bisher kein Konstrukt spezifischer PCR Assay zur Quantifizierung unbeabsichtigter Beimischung *pat*-Genhaltiger Rapsprodukte zur Verfügung.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Lücke mit der Entwicklung eines LL-Konstrukt spezifischen Real-Time PCR Assays zum Nachweis der *pat*-transgenen Rapslinie 'Falcon GS 40/90' geschlossen. Da aufgrund der unklaren Gesetzeslage der letzten Jahre eine Saatgutbeschaffung weiterer LL-Rapssorten unmöglich war, wurde die Spezifität dieses LL-Konstrukt PCR Assays neben der Rapslinie 'Falcon GS40/90' an den vorhandenen LL-Linien von Zuckerrübe und Mais ('T120-7', 'T25', Bayer CropScience AG) gezeigt. Aufgrund der Konstrukt-Zusammensetzung (LAG 2003) und der Herkunft der oben aufgeführten LL-Rapslinien von Bayer CropScience AG kann jedoch angenommen werden, dass auch sie mit dem entwickelten LL-Konstrukt PCR Assay detektiert werden können. Transgene GVP-Linien mit anderen Konstrukten ('MON810', 'Bt176') und konventionelle Sorten zeigten keine falschpositiven Signale. Damit wurde ein PCR Assay zur Quantifizierung von LL-Transgenanteilen aus verschiedenen Pflanzenspezies entwickelt, wie sie in Lebens- und Futtermittelbestandteilen vorkommen können.

4.1.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in der PCR-Analytik

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NG und BG) beschreiben die Empfindlichkeit eines Analyseverfahrens. Die NG kennzeichnet die kleinste nachweisbare Menge des Analyten, die vom Nullwert unterschieden werden kann. Die BG kennzeichnet die Analytkonzentration, die mit einem Zahlenwert eindeutig bestimmt werden kann. Die Begriffe der NG und BG wurden erstmals von KAISER (1947) geprägt. Er postulierte, dass die Termini immer zu einem vollständigen und definierten Analyseverfahren gehören sollten. Obwohl die PCR-Analyse durch die hohe Empfindlichkeit der Real-Time PCR eine zunehmende Bedeutung im Lebensmittelbereich gewinnt, sind die Begriffe NG und BG noch nicht eindeutig spezifiziert. Speziell die kürzlich festgelegten Schwellenwerte im GVP-Bereich (vgl. 1.1.3) verleihen der Nachweisempfindlichkeit eine neue Aktualität. So werden in Wissenschaftskreisen derzeit alle Faktoren näher untersucht, die einen evtl. Einfluss auf die Lage von NG und BG haben.

Die Nachweisempfindlichkeit war daher auch ein wichtiges Thema der vorliegenden Arbeit. Im Anschluss an die Entwicklung qualitativer und quantitativer PCR Systeme zum GVP-Nachweis erfolgte eine genaue Evaluierung der NG und BG. Ihre Lage wurde über Kalibrierstandards mit bekannter Kopienzahl eines transgenen Konstrukts bestimmt. Die Berechnung der NG und BG von Real-Time PCR Assays erfolgte mit verschiedenen Berechnungsmethoden, die im Folgenden diskutiert werden.

Festlegung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Qualitative PCR

Als NG einer konventionellen PCR wird die Kopienzahl angesehen, die nach EtBr-Anfärbung des gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produktes gerade noch eine visuell erkennbare Bande zeigt. Sie wird dann erreicht, wenn 50% der wiederholten Reaktionen bei entsprechender Kopienzahl auf dem Agarosegel keine Signale mehr zeigen. Der Farbstoff zur Anfärbung der PCR-Produkte sowie Typ und Einstellungen der Geldokumentation (insbesondere der Kamera) nehmen den größten Einfluss auf die Lage der NG. Mit der qualitativen PCR ist daher nur eine grobe Schätzung der NG möglich.

In Tabelle 4-12 sind NG für qualitative PCR Assays zum Transgennachweis von verschiedenen Autoren den NG dieser Arbeit gegenübergestellt. Die evaluierte NG des *pat*-Gen spezifischen PCR Assays befand sich je nach Verwendung von gemischten oder verdünnten genomischen (MG- und VG-) Standards in einem Intervall von 20 -100 bzw. 16 - 163 Kopien. Damit lagen die absolute und die relative NG der MG-Standards mit 0,01% im Durchschnitt der NG,

die in der Literatur für Transgen spezifische PCR Assays angegeben werden. Auch die NG des 35S-Screening PCR Assays mit VG-Standards lag mit 1-11 Kopien im selben Intervall wie bei anderen Autoren.

Tabelle 4-12: Nachweisgrenzen für qualitative PCR Assays von GVP

Zielsequenz	Genotyp	Standards	PCR	NG/ Kopien	NG/ %	Autor
Referenz Assays						
25/18S rDNA	Weizen	MS	S	-	0,01	KÖPPEL et al. 1998
<i>Lectin I</i>	RR-Soja	VG	S	~200	-	KÖPPEL et al. 1997
<i>Zein</i>	Bt176	VG	S	10	-	STUDER et al. 1997
Screening Assays						
P-35S	RR-Soja	MS	S/M	-	0,01 / 0,1	HURST et al. 1999
		MS	S	4	0,01	VOLLENHOFER et al. 1999
		CRM	S	-	0,1	HARDEGGER et al. 1999
		CRM	M	-	1	LIN et al. 2000)
		MG	S	-	0,1	VAN DUIJN et al. 2002
	Bt176	MS	S	20	0,1	VOLLENHOFER et al. 1999
		VG	S	10	-	STUDER et al. 1997
LL-Raps	VG	S	1-11	-	DIESE ARBEIT	
T-NOS	RR-Soja	CRM	M	-	1	LIN et al. 2000
		CRM	S	-	0,1	HARDEGGER et al. 1999
		MS	S	4	0,01	VOLLENHOFER et al. 1999
Transgen Assays						
<i>CryIA(b)</i>	Bt176	MS	S/M	-	0,001 / 0,01	HURST et al. 1999
		MG	S	2	0,01	VOLLENHOFER et al. 1999
		MS	S	5	0,01	EHLERS et al. 1997
		VG	S	~10	-	STUDER et al. 1997
		VG	S	(1-) 2	(0,0005-) 0,001	JANKIEWICZ et al. 1999
		MG	S	(2-) 9	(0,001-) 0,005	JANKIEWICZ et al. 1999
<i>pat</i>	LL-Raps	MG	S	20-100	(0,01-) 0,05	DIESE ARBEIT
		VG	S	16-163	-	
<i>bar</i>	Gerste	MPG	S	1	0,00001	VICKERS ET AL. 1996
<i>epsps</i>	RR-Soja	CRM	M	-	0,1	LIN et al. 2000
Konstrukt Assays						
P-35S/ <i>bar</i>	Bt176	MG	S	-	0,01	VAN DUIJN et al. 2002
P-35S/ <i>pat</i>	T120-7	VG	S	-	<0,1	WAIBLINGER et al. 1999
P-35S/ <i>pat</i>	GS40/90	VG	S	-	<0,1	WAIBLINGER et al. 1999
P-35S/ <i>pat</i>	LH82	VG	S	-	<0,1	WAIBLINGER et al. 1999
P-35S/ <i>CryIA(b)</i>	Bt176	MG	S	-	0,01	HUPFER et al. 1998
CDPK/ <i>CryIA(b)</i>	Bt176	k. A.	S	-	0,1	CHIUEH et al. 2001
		CRM	M	-	0,1	LIN et al. 2000
	MON810	k. A.	S	-	0,01	CHIUEH et al. 2001
<i>Ivs6/CryIA(b)</i>	Bt11	k. A.	S	-	1	CHIUEH et al. 2001

NG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze; Standards: VG = 'verdünnte genomische' DNA, MS = 'gemischte Samen' (w/w), MG = 'gemischte genomische DNA', MPG = 'gemischte plasmidale & genomische DNA', CRM = zertifiziertes GVP-Referenz Mahlgut; S = ('Single-') Monoplex-PCR, M = Multiplex-PCR, k.A = keine Angabe.

Tabelle 4-12 (Fortsetzung): Nachweisgrenzen für qualitative PCR Assays von GVP

Zielsequenz	Genotyp	Standards	PCR	NG/ Kopien	NG/ %	Autor
Konstrukt Assays						
P-35S/ <i>pat</i>	LL-Raps	VG	S	16-160	-	DIESE ARBEIT
		MG	S	20-100	0,001-0,005	DIESE ARBEIT
P-35S/ <i>epsps</i>	RR-Soja	MS	S/M	-	0,01 / 0,1	HURST et al. 1999
		MS	S	4	0,01	VOLLENHOFER et al. 1999
<i>epsps</i> / CTP	RR-Soja	MS	S/M	-	0,01 / 0,1	HURST et al. 1999
		MS	S	-	0,02	VAN HOEF et al. 1998
		VG	S	(6-) 30	(0,001)-0,005	JANKIEWICZ et al. 1999
		MG	S	(6-) 30	(0,001)-0,005	JANKIEWICZ et al. 1999
		VG	S	~20	-	KÖPPEL et al. 1997
		MG	S	-	0,001	VAN HOEF et al. 1998
<i>epsps</i> / T-NOS	RR-Soja	MG	S	-	0,01	VAN DUIJN et al. 1999
P-35S/ <i>epsps</i>	RR-Soja	VG	S	-	0,001	WURZ und WILLMUND 1997
P-35S/ <i>hsp70</i>	MON810	MG	S	-	0,01	ZIMMERMANN et al. 1998a
Event Assays						
5- Soja/ RR-3'	GTS	VG	S	5	-	TAVERNIERS et al. 2001
<i>Cry9c</i>	CBH-351	VG	S	10	-	WINDELS et al. 2003

NG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze; Standards: VG = 'verdünnte genomische' DNA, MS = 'gemischte Samen' (w/w), MG = 'gemischte genomische DNA'; S = ('Single'-) Monoplex-PCR, M = Multiplex-PCR.

Quantitative PCR

In der Real-Time PCR wird die Empfindlichkeit des Verfahrens ebenfalls durch die Verwendung von Kalibrierstandards bestimmt. Die Beziehung zwischen den logarithmierten Kopien der Standardstufen und den gemessenen Fluoreszenzwerten lässt sich in einer linearen Regression darstellen. Dabei werden die Standards mehrmals während des selben PCR-Laufs gemessen, um über die Streuung der Kopienzahlen die Empfindlichkeit des Verfahrens abzuleiten. Im Gegensatz zur qualitativen PCR können bei einer Real-Time PCR NG und BG angegeben werden. Dazu ist es wichtig, dass der Ct-Wert stets im linearen Bereich der logarithmischen Fluoreszenzkurve liegt und die PCR-Effizienzen innerhalb der Proben sowie zwischen Proben und Standards ähnlich sind (PEIRSON et al. 2003). Ideal wäre nach TICHOPAD et al. (2003) die Bestimmung und der Abgleich der Effizienzen jeder Einzelprobe.

Über die Berechnung von NG und BG besteht bislang in der Literatur Uneinigkeit. So gaben HÖHNE et al. (2002) ohne Erhebung statistischer Parameter für verschiedene GV-Maislinien eine NG von 0,01% an. Andere Autoren schätzten die NG und BG ebenfalls ohne statistische Berechnungsgrundlagen über die Fluktuation der Fluoreszenzkurven bei wiederholt gemessenen Kalibrierstandards. TAVERNIERS et al. (2001) leiteten die NG je nach An- bzw. Abwesenheit von Fluoreszenzkurven bei niedrigen Kopienzahlen ab. BERDAL und HOLST-JENSEN

(2001) sowie HERNÁNDEZ et al. (2003) legten die BG mit Hilfe dieser Methode bei der Kopienzahl fest, bei der die Fluoreszenzkurven um mehr als einen Ct-Wert schwankten. Tabelle 4-13 zeigt eine Zusammenstellung der via Real-Time PCR kalkulierten NG und BG.

Tabelle 4-13: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für GVP mit quantitativen PCR Assays

Zielsequenz	Genotyp	Linie	Standard	PCR	NG	BG	Autor
Referenz Assays							
S_GT	LL-Raps	Falcon	VP	S	<13	13-126	DIESE ARBEIT
		GS40/90	VG	S	<3,8	3,8-38	DIESE ARBEIT
PEPC-3	LL-, RR-Raps		VG	S	20	20-78	ZEITLER et al. 2002
Screening Assays							
P-35S	LL-Raps	Falcon GS40/90	VG	S	<3,8	3,8-38	DIESE ARBEIT
Transgen Assays							
<i>epsps</i>	RR-Raps	GT73	VG	S	20-78	78-313	ZEITLER et al. 2002
<i>cryIA(b)</i>	RR-Soja	30-3-2	MG	-	5	30	HÜBNER et al. 2001
<i>pat</i>	LL-Raps	Falcon GS40/90	VG	S	<20	20-78	ZEITLER et al. 2002
Konstrukt Assays							
<i>hsp70</i> <i>/cryIA(b)</i>	Bt-Mais	MON810	MPG	-	<20	(0,5%)	SHINDO et al. 2002
<i>ivs6</i> <i>/cryIA(b)</i>	Bt-Mais	Bt11	MPG	-	<20	(0,5%)	SHINDO et al. 2002
<i>cryIA(b)</i> <i>pep-I9</i>	Bt-Mais	Bt176	MPG	-	<20	(0,5%)	SHINDO et al. 2002
<i>pat</i> /T-35S	LL-Mais	T25	MPG	-	<20	(0,5%)	SHINDO et al. 2002
OTP/T-35S	RR-Mais	GA21	MPG	-	<20	(0,5%)	SHINDO et al. 2002
Vector/ P-r-act	RR-Mais	GA21	VP	M	0,01% (13)	40	HERNANDEZ et al. 2004
P-35S/ <i>epsps</i>	RR-Soja	30-3-2	VP	-	10	50	WAIBLINGER et al. 2001
	LL-Raps	Falcon GS40/90	VG	S	2,8-28	28-279	BLOCK und SCHWARZ 2003
			VP	S	<13	<13	BLOCK und SCHWARZ 2003
			MG	S	<26	<26	BLOCK und SCHWARZ 2003
			MS	S	<21	21-206	BLOCK und SCHWARZ 2003
			MPG	S	<21	21-213	BLOCK und SCHWARZ 2003
Event Assays							
3'-Mais/ MON810	Bt-Mais	MON810	MS	S	1	10	HERNANDEZ et al. 2003
			VP	S	1	10	HERNANDEZ et al. 2003
5'-Bt11/ Mais-3'	Bt-Mais	Bt11	VG	S	10	40	RØNNING et al. 2003
5'-RR/ Soja-3'	RR-Soja	30-3-2	MS	S	1	30	BERDAL und HOLST- JENSEN 2001

NG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze; Standards: VG = 'verdünnte genomische' DNA, VP = 'verdünnte plasmidale' DNA, MS = 'gemischte Samen' (w/w), MG = 'gemischte genomische DNA', MPG = 'gemischte plasmidale & genomische DNA', S = ('Single-') Monoplex-PCR, M = Multi-plex-PCR.

In dieser Arbeit wurden zwei Methoden zur Schätzung der Verfahrensempfindlichkeit verglichen. Beide Verfahren sind in der Deutschen Industrienorm (DIN) beschrieben und wurden für die Methodik der Real-Time PCR angepasst. Die erste Methode beruht auf der DIN 53804 (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG 2002) und wurde von WAIBLINGER (2001) als pragmatischer Ansatz zur Schätzung von NG und BG vorgeschlagen.

Bei dem Verfahren werden aus der Standardabweichung des Mittelwertes für jede Kalibrierungsverdünnungsstufe relative Vertrauensintervalle (rel. VI) abgeleitet. Je schmaler ein rel. VI ist, desto höher die Präzision des Verfahrens. Steigt ein rel. VI über 30% ist die BG überschritten, steigt es über 100%, ist die NG überschritten. Wie in der qualitativen PCR-Analytik können aufgrund der diskreten Verteilung der Standardstufen nur Intervalle angegeben werden, in denen sich die gesuchten NG oder BG befinden. Sie werden in dieser Arbeit als 'BG/ NG Intervall' gekennzeichnet. Dieser Ansatz kam in der GVO-Analytik bereits mehrmals zum Einsatz (HÜBNER et al. 2001; ZEITLER et al. 2002; BLOCK und SCHWARZ 2003). Die so kalkulierten NG und BG dieser Arbeit wurden den Literaturangaben in Tabelle 4-13 gegenüber gestellt.

Im Gegensatz dazu ist die Reststandardabweichung der gemessenen Kopienzahlen um die Kalibrierfunktion die Berechnungsgrundlage der DIN 32645 zur Bestimmung von NG und BG (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG 1994). Die DIN 32645 erlaubt durch eine Intrapolation entlang der Regressionsgeraden eine exakte Angabe von NG und BG. Die daraus abgeleiteten NG und BG erhielten die Indizes 'Exakt'.

Tabelle 4-14: Zusammenstellung verschiedener NG und BG für den Real-Time PCR Assay des LibertyLink®-Konstruktes

Ziel-Sequenz	Standards	Probe		Exakt				Intervall			
		NG ‰	BG ‰	NG		BG		NG		BG	
				Kopie	‰	Kopie	‰	Kopie	‰	Kopie	‰
P-35S/ pat	MS	0,005	~0,015	1,6	0,008	4,9*	0,024*	<21	<0,10	21-206	1,00
P-35S/ pat	MG	0,004	~0,012	1,3	0,005	4,0	0,016	<26	<0,11	<26	<0,11
P-35S/ pat	MPG	0,004	~0,013	1,4	0,006	4,1*	0,009*	<21	<0,10	21-213	1,00

NG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze; Standards: MS = 'gemischte Samen' (w/w), MG = 'gemischte genomische DNA', MPG = 'gemischte plasmidale & genomische DNA', * Kennzeichnung der NG/BG-Exakt, die außerhalb des 'NG/BG-Intervall' liegen.

Zur Gegenüberstellung der in dieser Arbeit berechneten NG und BG wurden die Ergebnisse für gemischte Standards und den LL-Konstrukt spezifischen PCR Assay aus Tabelle 3-5 exzerpiert und in Tabelle 4-14 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass die Werte für NG/BG 'Exakt' sehr niedrig sind. Hinsichtlich der hohen Unsicherheit der Messwerte vorhergehender Analyseschritte (DNA-Konzentrationsmessung, Pipetierschritte, PEIRSON et al. 2003) und der

von einigen Arbeitsgruppen beschriebenen Ergebnisunsicherheit bei weniger als zehn Genkopien (SOONG und LADÁNYI 2003) sollte die NG etwas höher gesetzt werden. Ein fünf- bis zehnfacher Sicherheitsfaktor erscheint sinnvoll.

Neben den verschiedenen Ansätzen, die NG und BG in der Real-Time PCR zu ermitteln, gibt es einige Definitionen von NG und BG in der Literatur. Die meisten Autoren differenzieren absolute NG bzw. BG, die sich auf minimal nachweisbare bzw. bestimmbare Kopienzahlen beziehen und relative NG und BG. Letztere werden nach BERDAL und HOLSTJENSEN (2001) abgeleitet aus dem prozentualen Verhältnis der eingesetzten bzw. der maximal einsetzbaren Kopienzahl zu den ermittelten NG und BG der Transgenkopien.

Die theoretisch absolute NG, die nicht unterschritten werden kann, liegt bei einer Kopie des Zielgens. Sie lässt sich relativ zur Gesamtkopienzahl ableiten, die für die PCR eingesetzt wurde und variiert für jedes Genom aufgrund der maximal einsetzbaren DNA-Menge, der Genomgröße des Genotyps (HÜBNER et al. 2001), des Ploidiestatus und/oder der Anzahl integrierter Transgenkopien. Unter Vorgabe der maximal einsetzbaren DNA-Menge lässt sich aus diesen Faktoren der minimal nachweisbare Transgenanteil in Abhängigkeit vom Genotyp ableiten ($\%NG_{\text{Genotyp}}$), siehe Tabelle 4-15. Nach HÜBNER et al. (2001) kann aus der $\%NG_{\text{Genotyp}}$ wiederum eine $\%BG_{\text{Genotyp}}$ abgeleitet werden.

Tabelle 4-15: Theoretische Nachweisgrenzen für Kulturpflanzen

Genotyp	Ploidie		1C / pg		$\%NG_{\text{Genotyp}}$		TKG / g	Individuen / kg	
	n	(x)	n	(x)	n	(x)		n	(x)
Raps	2	(4)	1,23	(0,62)	0,0006	(0,0003)	3,8	0,62	(1,24)
Weizen	2	(6)	16,55	(5,52)	0,0083	(0,0027)	42	0,48	(1,45)
Gerste	2	2	5,05		0,0025		30	1,19	
Mais	2	2	2,60		0,0013		280	22	
Soja	2	(4)	1,15		0,0006	(0,0003)	180	35	(70)
Zuckerrübe	2	2	1,57		0,0008		28	3,57	
Kartoffelknolle	2	(4)	3,59	(1,80)	0,0018	(0,0009)	150 000	8 350	(16 700)

1C = Genomäquivalent (GÄ); NG berechnet auf der Grundlage von 200 ng und zwei integrierten Genkopien pro diploidem Genom; n = diploides Genom, (x) = Anzahl homologer Chromosomen bei Kartoffel und Soja bzw. homöologer Chromosomen bei Weizen und Raps; TKG = Tausendkorngewicht; als Grundlage des TKG bei Zuckerrübe diente pilliertes Saatgut.

Aus der zur PCR eingesetzten DNA-Menge lässt sich andererseits der minimal nachweisbare Transgenanteil jeder Einzelprobe berechnen ($\%NG_{\text{Probe}}$). Wird für diploiden Raps eine einsetzbare DNA-Menge von maximal 200 ng DNA pro PCR-Reaktion und ein GÄ von 1,225 Genkopien pro haploidem Genom angenommen, so liegt die NG_{Genotyp} bei einer von 163 265 Kopien, also bei einem relativen Transgenanteil von 0,0006%. Da bei der LL-Linie 'Falcon GS40/90', zwei Kopien pro haploidem Genom integriert sind, reduziert sich NG_{Genotyp} auf

0,0003%. Stammt jede Genkopie in der PCR-Analyse von einem anderen Individuum, und ist eins davon transgen, so kann man eines von 163 265 Individuen (z.B. Samen) nachweisen. Dazu müsste bei Raps (3,8 g TKG) mindestens 0,62 kg Samen verarbeitet werden (vgl. Tabelle 4-15). Unter Berücksichtigung der Ploidiestufe (x) errechnet sich bei polyploiden Pflanzen eine entsprechend kleinere %NG_{Genotyp}. Bei der Analyse von Samen stellen die verschiedenen Gewebeschichten mit ihren unterschiedlichen Ploidiestufen (KRUSE 2002) ein gewisses Problem dar. Da das Endosperm in der Regel 3C pro Zellkern besitzt (ANONYMUS 2003), kann vor allem bei endospermreichen Samen der Transgenanteil überschätzt werden. So berichten TERZI et al. (2003) von Quantifizierungsproblemen bei Durumweizen, dessen Samen Gewebeschichten von 3C, 6C, 12C und 24C besitzen können.

Bislang fehlen eindeutige EU-Richtlinien, aufgrund welcher Kriterien der Transgenanteil im Saatgut geschätzt werden soll. Das Verhältnis transgener zu konventionellen Samen ist als Grundlage zur Berechnung der Transgenanteile ebenso möglich, wie das Verhältnis transgener Genkopien zur Kopienzahl eines Referenzgens mit oder ohne Berücksichtigung der Anzahl integrierter Transgenkopien pro haploidem Genom und des Ploidiestatus.

Einflussfaktoren auf die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Lage der NG und BG wird in der PCR-Analytik von vielen Faktoren beeinflusst. Bereits die Art des DNA-Aufbereitungsprozesses hat einen Effekt auf die Empfindlichkeit, die in der PCR-Reaktion erreicht werden kann.

HÜBNER et al. (2001) leiten ab, dass sich aus einem akzeptablen Variationskoeffizienten von 20% ergibt, dass eine PCR-Probe mindestens 25 Partikel enthalten muss. Um 25 oder mehr GVP-Partikel mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit in den PCR-Proben zu erhalten, sollte die Probe jedoch mindestens 35 Partikel aufweisen. KURIBARA et al. (2002) bestimmten bei Mischungen von GVP- und nicht GVP-Samenmaterial die Partikelgröße um sicher zu stellen, dass nach der DNA-Isolation genügend GVP-Partikel vorhanden sind. Sie fanden bei Mais Durchmesser von 10,7 µm und bei Soja von 16,1 µm, womit 1 g Mahlgut 1 100 000 Mais- bzw. 330 000 Sojapartikel enthielten. Die Partikelgröße des Mahlgutes hat zudem einen Einfluss auf die Effizienz der extrahierten DNA. Die Größenfraktionen der Partikel gehen z.T. auf verschiedene Gewebeschichten des Samens zurück, wie Embryo, Endosperm und Samenschale, die sich in Struktur und Härte unterscheiden (PROKISCH et al. 2001). Da die Gewebe im DNA-Gehalt und der Ploidiestufe variieren, kann dies den GVP-Anteil des Mahlgutes beeinflussen. Für das kommerziell vertriebene 'Certified Reference Material' (CRM, FLUKA, S-Buchs) gehört die Bestimmung der Partikelgröße daher zur Routine (TRAPMANN et al. 2001).

Grundlage der PCR-Analyse sollte generell eine optimale DNA-Qualität sein, da PCR-Hemmstoffe wie Polysaccharide, Proteine und Komplexbilder die einsetzbare DNA-Menge herabsetzen und damit NG und BG erhöhen (HÖRTNER 1997; VAN DUJIN et al. 2002).

Während der PCR werden nach HÜBNER et al. (2001) die NG und BG vor allem durch Parameter wie Mg-Konzentration, PCR-Primer und Annealing-Temperatur bestimmt. PECCOUND und JACOB (1996) berichten, dass sich sogar molekulare Fluktuationen auf die Empfindlichkeit der PCR auswirken können. Den Einfluss der Zyklenzahl auf die NG belegten bereits WURZ und WILLMUND (1997) am Beispiel von RR-Soja sowie HURST et al. (1999) bei RR-Mais. Für die zwei event spezifischen PCR Assays der 5'- bzw. 3'-Übergangsregion von RR-Soja fanden TAVERNIERS et al. (2001) bei 35 PCR-Zyklen zwei verschiedene NG mit 141 und 70 Kopien. Bei 40 Zyklen glich sich die Differenz wieder auf fünf Kopien an.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass für LL-Raps der P-35S Screening PCR Assay um ca. das zehnfach empfindlicher war als der *pat*-Gen spezifische PCR Assay. Dies bestätigen auch Untersuchungen von LIN und Mitarbeitern (2000), die durch einen Vergleich der P-35S, T-NOS, und EPSPS Assays an RR-Soja belegen konnten, dass die Empfindlichkeit für denselben Genotypen je nach PCR Assay variieren kann. Zudem wiesen sie nach, dass auch der selbe P-35S Screening Assay für RR-Soja und Bt-Mais mit einer NG von 0,1% bzw. 1% verschieden sein kann. Den Effekt von Monoplex- bzw. Multiplex-PCR auf die NG von GVP untersuchte die Arbeitsgruppe von HURST (1999). Sie ermittelten einen zehnfachen Anstieg der NG in Multiplexreaktionen. All diese Faktoren müssen vor der Validierung und dem Einsatz von PCR Assays für den GVO-Nachweis berücksichtigt werden.

Ferner hat die Wahl der Kalibrierstandards einen Einfluss auf die Empfindlichkeit der PCR. Dabei bestimmt die Abstufung der Verdünnungsstufen die Breite des Intervalls, in dem NG und BG liegen und die Art der Kalibrierstandards beeinflusst die Matrixeffekte. In Kapitel 4.1.3 werden Auswirkungen der Kalibrierstandards auf die Lage von NG und BG diskutiert.

4.1.3 Kalibrierstandards in der PCR-Analytik

Als Kalibrierstandards werden in der PCR-Analytik eine Reihe von DNA-Proben bezeichnet, deren DNA-Gehalt einer Zielsequenz stufenweise abnimmt. Da in der Real-Time PCR mit den Datenpunkten der Standards die Kalibrierfunktion abgeleitet wird, ist die Validierung geeigneter Standards entscheidend für die Etablierung eines robusten und präzisen Real-Time PCR Systems.

Die Herstellung und Evaluierung verschiedener genomischer und plasmidaler DNA-Kalibrierstandards war daher ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Genomische DNA-Kalibrierstandards

Genomische Kalibrierstandards werden durch die DNA-Isolation von GVP-Linien erzeugt, die die gewünschten Nukleotidsequenzen zum PCR-Nachweis enthalten. Zwei Hauptarten genomischer Standards wurden in dieser Arbeit hergestellt und eingesetzt: 'gemischte Samen'-(MS-) und genomische DNA-Standards. Bei den MS-Standards werden konventionelles und GVP-Saatgut in verschiedenen Mengenverhältnissen vermahlen und danach die DNA extrahiert. Bei den genomischen DNA-Standards wird die DNA des GVP-Saatguts dagegen erst isoliert und anschließend in den gewünschten Verhältnissen stufenweise mit Wasser verdünnt (VG-Standards) oder mit DNA konventioneller Rapssorten gemischt (MG-Standards).

In vielen Studien zur Quantifizierung von GVP-Proben wurde als Referenzmaterial das auf dem Markt erhältliche zertifizierte CRM von FLUKA (S-Buchs) verwendet (BERDAL und HOLST-JENSEN 2001; HERNÁNDEZ et al. 2003). CRM ist als gemahlene Samenmaterial mit definierten GVP-Anteilen im Prinzip ein MS-Standard, wobei die DNA-Extraktion vom Anwender erfolgt. Ein großes Problem dabei ist jedoch, dass CRM nicht für alle GVP-Linien verfügbar ist. Aktuell wird es lediglich für die Maislinien MON810, Bt176, und Bt11 angeboten. Zudem ist CRM nur mit den Transgenanteilen von 0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2% 5% erhältlich. Nach PARDIGOL et al. (2003) schränkt dies die Einsatzmöglichkeit von CRM stark ein, da zur Quantifizierung von Proben eine Extrapolation der Kalibrierfunktion vermieden werden sollte. So konnten die Arbeitsgruppen von HARDEGGER (1999) und LIN (2000) durch Einsatz von CRM keine NG unter 0,1% bestimmen. Autoren wie VAN DUIJN et al. (2002), JAN-KIEWICZ et al. (1999) und VOLLENHOFER et al. (1999) gingen daher dazu über, CRM zu verdünnen oder mit DNA konventioneller Sorten zu mischen um NG von 0,001-0,01% zu erzielen (Tabelle 4-12).

Die Konstanz der CRM-Qualität ist ebenfalls ein kritischer Faktor, der sich nach PAULI et al. (2001) bei der GVP-Quantifizierung als problematisch erweisen kann. Ein Grund hierfür sind ungewollte Qualitätsschwankungen des CRM-Mahlgutes aufgrund seiner Herkunft aus landwirtschaftlichen Produkten. Faktoren wie Sorte, Anbauregion und Kulturjahr können durch eine Veränderung der Inhaltsstoffe die Qualität der DNA-Isolation beeinflussen (KURIBARA et al. 2002). Schließlich hat die Lagerung des Ernte- und Mahlgutes einen Einfluss auf die DNA-Qualität bzw. das Ausmaß der DNA-Degradierung. BRODMANN und Mitarbeiter (2002) konnten bei Real Time PCR-Messungen eines Mais spezifischen Referenzgens Sortenunterschiede feststellen, die sie auf mögliche DNA-Degradierungen, verursacht durch unterschiedliche Lagerbedingungen des Pflanzenmaterials zurückführten.

Probleme, die aus der Variabilität und Lagerung des Pflanzenmaterials resultieren, könnten durch die Verwendung genomischer DNA-Kalibrierstandards vermieden werden. So verglich die Arbeitsgruppe von VAN HOEF (1998) die Empfindlichkeit der PCR gegenüber MS- und MG-Standards mit einem Konstrukt PCR Assay für RR-Soja und fanden eine 20fach niedrigere NG für die MG-Standards. Im allgemeinen ist die DNA nach Anwendung einer etablierten Isolationsmethode in geeigneten Puffersystemen und entsprechender Lagerung bei 4°C unempfindlicher gegenüber Degradierungsprozessen als Pflanzenmaterial. Lyophilisierte DNA bereitet selbst beim Versandt keine Probleme.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Kalibrierstandards auf die Lage von NG und BG in der Real-Time PCR über die Wiederfindungsfunktionen (W_F) ermittelt. Die W_F erlaubt über einen Vergleich von Soll- und Istwerten eine Aussage über die Richtigkeit und Robustheit der Analyse. Bei einer 100%igen Übereinstimmung zwischen eingesetzten und gemessenen Kopienzahlen wird eine W_F -Steigung von 1,0 erreicht, wobei der optimale Bereich nach WAIBLINGER (2001) eine W_F -Steigung von 0,7-1,2 umfasst.

Es zeigte sich, dass die MG-Standards mit einer W_F -Steigung von 1,07 den MS-Standards mit 1,32 deutlich überlegen waren. Ein Grund für die bessere W_F der MG-Standards kann die exaktere Quantifizierungsmöglichkeit der GVP-Anteile auf DNA-Ebene gegenüber den MS-Standards auf Samenebene sein. Die Einstellung des GVP-Anteils erfolgt bei MS-Standards über gewogene oder abgezählte Samen (diskret) und bei MG-Standards über eine Anpassung der DNA-Konzentration (kontinuierlich). Die Samen von GVP- und konventionellen Sorten können dabei in den Inhaltsstoffen und im Wassergehalt variieren (herkunftsbedingt und genotypisch), was u.U. die Effizienz der DNA-Extraktion beeinflusst. Solche Unterschiede werden bei MG-Standards vor der DNA-Mischung auf dem Agarosegel erkannt. Falls nötig erfolgt eine Anpassung der DNA-Qualität durch zusätzliche Aufreinigungsschritte.

Um den Effekt der Hintergrund-DNA auf die NG bzw. BG der PCR zu prüfen, wurde die Empfindlichkeit von MG- und VG-Standards mit dem *pat*-Gen spezifischen und dem LL-Konstrukt Real-Time PCR Assay verglichen. Obwohl keiner der beiden PCR Assays Sensitivitätsunterschiede zwischen MG- und VG-Standards erkennen ließ (Tabelle 4-12 und 4-13), deckte die Evaluierung der Wiederfindungsrate deutliche Unterschiede auf. Mit einer W_F -Steigung von 1,34 zeigten VG-Standards über alle Stufen zu niedrig bestimmte Transgenkonzentrationen (Tabelle 3-6). JANKIEWICZ et al. (1999) stellten DNA-Hintergrund bedingte Unterschiede dagegen auf dem Niveau der Nachweisempfindlichkeit fest. Sie wiesen mit einem *CryIA(b)*-Gen spezifischen PCR Assay eine 4,5fach erhöhte Sensitivität von MG- gegenüber VG-

Standards bei Mais nach (Tabelle 4-12). Für einen RR-Konstrukt PCR Assay bei Soja konnten die Autoren keine Matrixeffekte belegen.

Da die Grundlage genomischer Standards pflanzliche DNA ist, sollte das Ausgangsmaterial gut charakterisiert werden. Bereits der Reinheitsgrad der Sorten kann problematisch sein. So fanden KURIBARA et al. (2002) transgenes Saatgut, das mit anderen GVP-Linien kontaminiert war. Sogar der genetische Hintergrund der GVP-Sorten hat Effekt auf die GVP-Quantifizierung (PARDIGOL et al. 2003). Vor allem in der Hybridzüchtung werden nach HÜBNER et al. (2001) homo- und heterozygote GVP-Sorten sowie Sorten verschiedener Ploidiestufen eingesetzt. Selbst die Kopien integrierter Gene, regulatorischer Sequenzen bzw. ganzer Genkonstrukte können von Sorte zu Sorte variieren (TAVERNIERS et al. 2001), vgl. Tabelle 4-3.

Eine besondere Erschwernis bei der Entwicklung und der Durchführung der GVP-Diagnostik ist der Erhalt von GVP-Referenzmaterial. Durch die restriktive Politik in der 'grünen Gentechnik' und die EU-weite Novellierung der Gesetzestexte sind Pflanzenzüchter und Biotechnologiefirmen mit der Aushändigung von GVP-Material sehr zurückhaltend geworden.

Plasmidale DNA-Kalibrierstandards

Plasmidale Standards haben gegenüber genomischen den Vorteil, dass ihre genetische Konstitution nicht variiert. Die Zusammenstellung und die Anzahl transgener Nukleotidsequenzen obliegen dem Hersteller, sind daher bekannt und erlauben so eine exakte Quantifizierung unbekannter Proben. Dadurch sind plasmidale Standards gut zur Unterscheidung von homo- und heterozygoten Nachkommen geeignet. Dies konnte von SCHMIDT und PARROTT (2001) an Soja und Erdnuss, von den Arbeitsgruppen um KURIBARA (2002) und SHINDO (2002) an verschiedenen GV-Maislinien und RR-Soja sowie in der vorliegenden Arbeit an LL-Raps gezeigt werden. Selbst bei der GV-Maislinie 'GA21', die sechs Konstruktkopien enthält, gelang HERNÁNDEZ et al. (2004) eine korrekte Bestimmung des Transgenanteils in homo- und heterozygotem Probenmaterial. SHINDO und Mitarbeiter (2002) belegten in einem groß angelegten Ringversuch, dass sogar Plasmide mit acht verschiedenen GVP-Konstrukten zur exakten Bestimmung der GVP-Transformante verwendet werden können.

Ein weiterer Vorteil plasmidaler DNA ist, dass sie mit simplen Protokollen in hoher Reinheit isoliert werden kann. Die verschiedenen Matrizen, in denen sich genomische DNA befindet, verlangen angepasste DNA-Isolationsprotokolle gemäß ihrer Inhaltsstoffe. Im Gegensatz zur genomischen DNA werden zur Plasmid isolation keine speziellen Lösungen benötigt, die PCR-Hemmstoffe u. U. sogar einführen (ZIMMERMANN et al. 1998b). Da Plasmide stets den gleichen Hintergrund haben, kann die DNA-Qualität für Kalibrierstandards konstant gehalten

werden. Zudem können Plasmide in unbegrenzter Menge produziert werden und erfordern nicht die Beschaffung von zum Teil schwer zugänglichem pflanzlichen Referenzmaterial.

Ein wichtiger Faktor bei der Verwendung plasmidaler Standards ist ihre Vergleichbarkeit mit genomischer DNA, wie sie in Saatgut-, Lebensmittel- und Futterproben vorkommt. Vor allem in pasteurisierten (Temperatur $\geq 65^{\circ}\text{C}$) oder sauren Lebensmittelproben (pH-Wert ≤ 4) ist die DNA einer starken Degradierung ausgesetzt (HUPFER et al. 1998; LINDAHL 1993). Die Arbeitsgruppe von BAUER (2003) fand heraus, dass plasmidale DNA selbst unter diesen Bedingungen einer etwa gleich starken Fragmentierung unterliegt wie genomische DNA.

Aufgrund der hohen Kopienzahl pro Volumen können plasmidale Standards jeglichen Proben ohne messbare Verdünnungseffekte zugesetzt werden. So können die Matrixeffekte bestimmter Proben simuliert werden (SCHWARZ 2003). In der Lebensmittelbranche sind solche DNA-Zusätze zur Vermeidung Falschnegativer durch PCR-Hemmstoffe bereits üblich (MEYER 1999). Im Anschluss an die Injektion plasmidaler Standards kann die Wiederfindungsrate der DNA in den verschiedenen Matrizen von Lebensmittelproben evaluiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden plasmidale und genomische Standards in der Real-Time PCR untersucht. Auch hier waren die Unterschiede der W_F -Steigung aussagekräftiger als die Nachweisempfindlichkeit. So hatten 'verdünnte plasmidale' (VP-) Standards zwar die niedrigste NG, ihre W_F -Steigung von 0,84 disqualifizierte sie jedoch aufgrund kontinuierlich unterschätzter GVP-Anteile (Tabelle 3-6). Plasmidale Standards mit dem Hintergrund genomischer DNA ('gemischte genomische & plasmidale' Standards, MPG-Standards) zeigten mit 1,03 dagegen eine W_F -Steigung nahe dem Optimum von 1,0. Wie schon die Evaluierung der genomischen Standards zeigte, spielt auch bei plasmidalen Standards die Hintergrund-DNA bei der Probenquantifizierung eine wichtige Rolle. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig, dass in Gegenwart von Hintergrund-DNA plasmidale Kalibrierstandards genauso exakte Ergebnisse liefern wie gute genomische Kalibrierstandards.

Durch die Möglichkeit, die Konstrukte plasmidaler Standards thematisch zusammenzustellen, sind sie gegenüber genomischen Standards vielfältiger einsetzbar. So können z.B. Plasmide zum GVP-Screening erstellt werden, die nur regulatorische Sequenzen und Resistenzgene enthalten (vgl. Tabellen 4-5 und 4-5), Plasmide mit allen wichtigen Referenzgenen (vgl. Tabellen 4-1 und 4-2) oder Plasmide zur Differenzierung von GVP-Konstrukten und -Events (vgl. Tabellen 4-8, 4-9, 4-10 und 4-11).

Aufgrund der positiven Validierungsergebnisse dieser Arbeit und der oben aufgeführten Vorteile sind plasmidale Kalibrierstandards in der GVO-Analytik flexibel einsetzbar und sollten mittelfristig die problematischen CRM-Standards ersetzen.

4.1.4 GVP-Mikrochips

Auf dem Gebiet der Quantifizierung transgener DNA-Konstrukte ist die Real-Time PCR momentan zweifelsfrei die wichtigste Methode. Bevor es zur Quantifizierung von GVP-Anteilen kommt, sollten die vorhandenen GVP-Linien jedoch bekannt sein, um spezifische PCR Assays anwenden und Sequenzwiederholungen berücksichtigen zu können (vgl. 4.1.1).

Qualitative PCR-Analysen sind für solche GVP-Screenings zu aufwändig und ineffizient. Eine ideale Methode zum Nachweis vieler verschiedener DNA-Moleküle auf kleinstem Raum ist die Mikrochip-Technik. Mikrochips sind kleine Glas- oder Plastikträger, auf deren Oberfläche spezifische DNA-Fragmente in einem definierten Mikroraster (Mikroarray) fixiert sind. Durch Basenpaarungen erfolgt eine Bindung zwischen den immobilisierten DNA-Fragmenten und komplementären DNA-Proben, was zur Emission von Fluoreszenzsignalen führt. Mit dieser DNA-Hybridisierungstechnik können tausende von Nukleinsäuremolekülen auf kleinstem Raum parallel analysiert werden, womit ein hoher Probendurchsatz erreicht wird (PÖPPING 2001). Dabei ist der Bedarf an Reagenzien extrem gering (DIEHL et al. 2001).

Ihr Hauptanwendungsgebiet fanden DNA-Chips und Mikroarrays bislang auf den Gebieten der Genexpression und Genotypisierung (HERTZBERG et al. 2001). Im GVO-Bereich wurden bisher nur wenige Mikroarrays beschrieben (MOEHRLE et al. 2000). Doch obwohl die Entwicklung von GVO-Chips noch in ihren Anfängen steckt (PAN 2002), verspricht die Technik ein hohes Niveau an Reproduzierbarkeit und Präzision (BONFINI et al. 2001).

Durch geschickte Kombination von Oligonukleotiden zum Screening, Konstrukt und Spezies spezifischen Nachweis kann eine schnelle Identifizierung von in einer Probe vorhandenen GVP-Linien vorgenommen werden. KOK et al. (2002) berichten von einer solchen Methode, bei der sie Oligonukleotide für bestimmte Bereiche des GVO-Konstruktes mit Spezies spezifischen Oligonukleotiden zur Identifizierung von GVP-Linien kombinierten. BURNS et al. (2003) beschrieben sogar die Anwendung eines Event spezifischen PCR System zum Nachweis von RR-Mais auf Chipebene.

Mit der neuen EU-Richtlinie EC 1830/2003 wird die Rückverfolgbarkeit von GVP künftig eine wichtige Rolle bei der Überwachung pflanzlicher Primär- und Verarbeitungsprodukte spielen. Für diese Aufgabe ist neben dem Nachweis der GVP-Linie auch eine Sortenbestimmung sinnvoll. Mit Hilfe der 'Arrayed Primer Extension'-Technik könnten auf einem GVO-Chip DNA-Marker integriert werden, die über eine Detektion spezieller Punktmutationen zusätzlich eine Sortendifferenzierung erlauben (SHUMAKER et al. 1996; PASTINEN et al. 2000).

4.2 Bestimmung der Persistenz transgener Eigenschaften in der Agrarumwelt

4.2.1 Persistenz von herbizidtolerantem Raps auf den untersuchten Agrarflächen

Importiertes Saatgut der kanadischen Saatgutfirma Advanta Seeds enthielt im Jahr 2000 vorwiegend GV-Rapssamen der Sorte 'Hyola'. Das Saatgut, das einen unbekanntem Anteil resistenter Samen gegen glyphosat- und phosphinothricinhaltige Herbizide enthielt (FOE 2000), wurde auf deutschen Flächen angebaut. Von fünf der betroffenen bayerischen Agrarflächen erfolgte eine repräsentative Untersuchung der Transgenanteile. Um die Persistenz der Transgenkonstrukte während einer Untersuchungsdauer von drei Jahren auf den Agrarflächen zu bestimmen, wurde Saatgut, Erntegut und Ausfallraps beprobt.

Eine der beprobten Fläche war offensichtlich nur mit RR- und nicht mit LL-haltigem Saatgut kontaminiert, denn weder im Erntegut noch im Ausfallraps konnten LL-Anteile nachgewiesen werden (keine Saatgutprobe). Betrachtet man die in dieser Arbeit untersuchten LL-Transgenanteile näher (Tabelle 3-9), kann man bei den restlichen vier Flächen Schwankungen in den analysierten Einzelproben feststellen.

Von den fünf gezogenen Proben des Erntegutes waren häufig einzelne negativ bzw. nicht quantifizierbar (positiv). In den quantifizierten Proben mit 3200 Körnern konnten umgerechnet 1-7 GVP-Samen nachgewiesen werden. Dabei schwankten die LL-Transgenanteile über alle Flächen zwischen 0,022% und 0,189%, wobei Variationskoeffizienten (V_k) von 70% - 85% erreicht wurden. Da bei der Evaluierung der Wiederfindungsraten der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde, dass V_k -Schwankungen von maximal 25% durch die PCR-Analyse bedingt sind, dürften die LL-Anteile im Erntegut tatsächlich variiert haben. Zwar deuten diese Fluktuationen auf 'transgene Nester' im Rapsbestand hin, zum zweifelsfreien Nachweis reichen diese jedoch nicht aus. Die im Ausfallraps gemessenen Transgenanteile schwankten bei einigen Flächen dagegen so stark, dass tatsächlich von einer ungleichmäßigen Verteilung der GVP im Feld ausgegangen werden kann. Der LL-Transgenanteil der Einzelproben (1000 Pflanzen) schwankte auf den Flächen von 0,046% und 0,439% (0,5 – 4,4 GVP), dabei wurden V_k von bis zu 173% erreicht.

Bei näherer Betrachtung der RR-Transgenanteile (Tabelle 3-11) der untersuchten Agrarflächen fällt Fläche 1 auf. Obwohl die Erntegutproben RR-Anteile deutlich unter 0,25% zeigten (keine Saatgutprobe), wurden im Ausfallraps vom Herbst 2001 und 2002 relativ hohe RR-Anteile von 0,36% bzw. 0,29% gemessen. Der LL-Anteil dieser Fläche nahm dagegen

nicht wesentlich zu. Da die Hälfte von Fläche 1 im August 2002 mit einem glyphosathaltigen Breitbandherbizid abgespritzt worden war, könnte es zur Selektion von RR-Raps gekommen sein, als Ende September 2002 der Auflaufrops gesammelt wurde. Die Beobachtung, dass die Rapspflanzen unterschiedlich weit entwickelt waren, spricht ebenfalls dafür, dass einige Pflanzen die Herbizidspritzung überlebt hatten. Auch am Ackerrand, der regelmäßig einer Randbehandlung mit Glyphosat unterzogen worden war, wurden im Herbst 2001 und 2002 einzelne buschgroße Pflanzen mit Knospen- bzw. Blüten gefunden.

Die z.T. niedrigen Transgenanteile des Erntegutes von 0,02 bis 0,03% ergeben bei 3200 analysierten Samen ca. einen halben GVP-Samen (0,5). Dieses Ergebnis könnte auf einen heterozygoten Kreuzungsnachkommen eines homozygoten GVP mit einem konventionellen Elter zurück gehen. Auch Erntestaub kann transgene Anteile enthalten, was bei einer späteren Berechnung der GVP-Individuen zu Abweichungen führt. Die Problematik von Kreuzkontaminationen durch GVP-haltigen Staub bei der Ernte, beim Vermahlen und bei der Verarbeitung wurde bereits von MEYER (1999) beschrieben. Bei Maisproben wiesen BRODMANN und NICHOLAS (1999) eine GVP-Verunreinigung im Promillebereich nach, die sie ebenfalls auf GVP-Staubkontaminationen zurückführten.

Die Ergebnisse zeigen jedoch unzweifelhaft, dass selbst nach zwei Jahren noch transgener Raps in den Folgekulturen gefunden werden konnte. Die Anzahl von Auflaufropspflanzen nahm zwar von Jahr zu Jahr etwas ab, der GVP-Anteil blieb dabei jedoch relativ konstant.

4.2.2 Einflüsse auf die Persistenz transgener Eigenschaften von GVP

Genotyp

Einige Pflanzenstadien sind für die Überdauerung und Ausbreitung von GVP-Genen prädestiniert. In der generativen Phase einer Pflanze erfolgt der vertikale Gentransfer. Die räumliche Verteilung der Gene wird insbesondere durch den mobilen Pollen gewährleistet (SCHEFFLER et al. 1993). Dabei hängt das Potential des Gentransfers vor allem vom Befruchtungsmodus, der Menge und Langlebigkeit des Pollens, seiner Verbreitungsart und -distanz, der Bestandesdichte sowie von der Entfernung zu kreuzungskompatiblen Pflanzen ab.

Die in dieser Arbeit untersuchte Kulturart Raps besitzt aufgrund eines flexiblen Befruchtungsmodus ein hohes Auskreuzungspotential (EMIROGLU et al. 1985). Autogamie ist nach DIETZ-PFEILSTETTER und ZWERGER (1999) zwar vorherrschend, der Anteil an Allogamie variiert jedoch entsprechend der regionalen Verhältnisse (BECKER 1992). Nach HARMS (2003) beträgt in Norddeutschland der Anteil an Selbstbefruchtung bei Winterraps 70-80%, in Süddeutschland dagegen nur 40-60%. Die Überlebensdauer des Pollens liegt in einem Zeitraum von

24 Stunden bis zu einer Woche (MESQUIDA und RENARD 1982). Es besteht also prinzipiell die Möglichkeit, dass die transgen kontaminierte Rapskultur, die in dieser Arbeit untersucht wurde, ihre Gene mit dem Pollen auf kreuzungskompatible Arten übertragen hat.

Obwohl der wenig aerodynamische Rapspollen schlecht an eine Windverbreitung angepasst ist (CRESSWELL et al. 2003), kann er nach TIMMONS et al. (1995) in höheren Luftschichten Distanzen von 2,5 km überwinden. Innerhalb von 2,5 - 3 km Abstand blieb die Pollenkonzentration in Untersuchungen von RIEGER et al. (2002) auf dem niedrigen Niveau von ca. 0,03% konstant und war in größeren Distanzen nicht mehr nachweisbar. Zur Bestimmung der Flugdistanz vitaler Pollen wird der Befruchtungserfolg einer GVP-Pollenwolke auf konventionelle Sorten gemessen. Für Rapspollen wurden so Flugdistanzen von 3 m bis 400 m (MORRIS et al. 1994; SCHEFFLER et al. 1995; WILKINSON et al. 1995) nachgewiesen.

Der GV-Raps der in dieser Arbeit untersuchten Agrarflächen, könnte sich also über Windverdriftung des Pollens in weniger als 400 m entfernte Nachbarfelder mit kreuzungskompatiblen *Brassica*-Kulturen, eingekreuzt haben. Dabei sind nach Untersuchungen von MESQUIDA und RENARD (1982a) Distanzen unter 6-10 m besonders kritisch, da die Pollenkonzentration innerhalb dieser Entfernung auf 50% sinkt und ab 100 m nur noch 2-10% beträgt (MC CARTNEY und LACEY 1991). Rapspollen verbreitet sich jedoch nicht nur über Anemogamie, die Entomogamie trägt erheblich zum Pollentransfer bei. SAURE et al. (1999) konnten diverse Bienen, Schwebfliegen und Pflanzenwespen kartieren, die an einer Verbreitung von Rapspollen auf *Brassicaceae*-Arten beteiligt waren. Da die gelben Rapsblüten eine große Attraktivität auf Insekten ausüben und Aktionsradien von 800 m - 26 km gemessen wurden (CHAMBERS 1968; DIETZ-PFEILSTETTER und ZWERGER 2003; EICKWORT und GINSBERG 1980; WITT 1992), gelten sie als wichtige Pollenvektoren für GV-Raps. Auf den untersuchten Agrarflächen dieser Arbeit könnten Insekten zur Verbreitung des transgenen Rapspollens beigetragen haben.

Selbst zwei Jahre nach Anbau der GVP-haltigen Rapsorte konnten noch transgene Rapspflanzen nachgewiesen werden. Da blühende Pflanzen gefunden wurden, geht auch vom Ausfallraps ein gewisses Auskreuzungspotential aus. Einige der untersuchten Flächen grenzten im Untersuchungszeitraum unmittelbar an konventionelle Rapsanbauflächen. Selbst bei geringer Windverdriftung und Insektentätigkeit kann der GVP-Pollen des Ausfallrapses die kurzen Distanzen zum Nachbarfeld überwunden und konventionelle Rapspflanzen befruchtet haben. Solche Einkreuzungen von GVP-Genen in konventionelle Kulturen resultieren häufig in Qualitätsminderungen auf dem Agrarmarkt, (CALLAHAN 2000; HASLBERGER 2001; BOUCHIE 2002), vor allem im Hinblick auf die kürzlich verabschiedeten EU-Richtlinien für GVP-Schwellenwerte (vgl. Einleitung).

Ein Gentransfer von GV-Ausfallraps wird wahrscheinlicher, wenn in der Fruchtfolge wieder Sommerraps angebaut wird. In diesem Fall werden die Ausfallpflanzen nicht mit Herbiziden behandelt und die ackerbaulichen Maßnahmen fördern eine Überschneidung des Blühfensters. Auf einer betroffenen Fläche wurde im Beprobungszeitraum Senf als Zwischenfrucht gesät. Nach Untersuchungen von LEFOL et al. (1996) sind jedoch keine Hybridisierungen von Raps und Senf (*Sinapsis arvensis* L.) zu erwarten.

Aufgrund der Sympatrie der *Brassica*-Arten im europäischen Raum besteht bei Raps zusätzlich die Möglichkeit des Gentransfers auf Wildkräuter. So kann auf den kontaminierten Agrarflächen der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden, dass GVP-Pollen kreuzungskompatible Wildkräuter befruchtet haben. Die Introgression von GVP-Genen in den Genpool von Wildkräutern wird in der Öffentlichkeit kontrovers diskutiert. Diese Ereignisse sind zwar sehr unwahrscheinlich, wurden in Einzelfällen aber bereits beschrieben (LEFOL et al. 1996; SCOTT und WILKINSON 1998; RIEGER et al. 1999; CHEVRE et al. 2000).

Letztlich entscheidet die Persistenz der GVP-Linie, ob sich ihre Gene innerhalb der kreuzungskompatiblen Arten etablieren können. Die Einkreuzung von Herbizidtoleranzgenen in die Ackerbegleitflora ist nach LAWSON (1993) besonders problematisch, da resistente Pflanzen durch das Komplementärherbizid nicht bekämpft, sondern vielmehr selektiert werden. So ist auch auf den untersuchten Agrarflächen ein Aufschaukeln der Genfrequenzen bei gleichzeitigem Einsatz der komplementären Breitbandherbizide Basta[®] bzw. Liberty[®] denkbar.

In der Folgekultur stellen herbizidtolerante Durchwuchspflanzen ein pflanzenbauliches Problem dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Ausfallrapspflanzen gesammelt, die wahrscheinlich eine Spritzung des Komplementärherbizids RoundupReady[®] überlebt haben. Das Pflanzenstadium war so weit entwickelt, dass die Pflanzen bereits vor der Applikation des Breitbandherbizides aufgelaufen sein mussten. Da das kontaminierte Saatgut sowohl LL- als auch RR-Raps enthielt, ist auch die Bildung von doppeltresistentem Ausfallraps durch Kreuzungsereignisse möglich. Mehrfach herbizidtolerante GVP-Linien wurden bereits in einem Report des EU-Umweltamtes beschrieben (EASTHAM und SWEET 2002). Erste Untersuchungen zum Auftreten mehrfach herbizidresistenter GV-Rapspflanzen zeigten jedoch, dass diese nur entstehen, wenn die GVP-Linien in direkter Nachbarschaft gepflanzt wurden und auch dies tritt nur sehr selten auf. Bei der geringen LL- und RR-Kontamination der in dieser Arbeit untersuchten Flächen, die stets unter der kennzeichnungspflichtigen Schwelle von 0,9% (EU 1829/2003, BFR 2003) lagen, ist daher eine Bildung doppeltresistenter Pflanzen unwahrscheinlich.

Dem potentiellen Gentransfer von GVP-Pollen auf konventionelle Rapsbestände kann durch gezielte Sortenwahl der Nachbarbestände mit anderem Blühfenster einfach begegnet werden (RAYBOULD und GRAY 1994). Bei der Herstellung einer GV-Rapslinie minimiert die Insertion des transgenen Konstruktes ins C-Genom des Artbastards *B. napus* (AACC-Genome) bereits sein Auskreuzungspotential. Da Kreuzungen zwischen *B. napus* und *B. oleracea* (CC-Genome) selten sind, ist eine Integration des transgenen 'C-Gens' ins Kohlgenom unwahrscheinlich. Zwischen *B. napus* und *B. rapa* (AA-Genom) sind Kreuzungen zwar wahrscheinlicher, in den Zellteilungen nach der Befruchtung werden die C-Chromosomen nach Untersuchungen von CHAMBERLAIN und STEWART (1999) sowie EASTHAM und SWEET (2002) jedoch meist wieder aus dem Rübsengenom eliminiert. Eine andere Möglichkeit wäre der Einsatz maternal vererbender GVP-Linien, wie es für einige Kulturen bereits beschrieben wurde (DANIELL 1998; KHAN und MALIGA 1999; RUF et al. 2001). Diese GVP werden mittels Plastidentransformation hergestellt (MALIGA 1999 KLAUS et al. 2004). (Pro-) Plastide befinden sich nur in seltenen Ausnahmefällen im Pollen und werden nach der Befruchtung meist eliminiert. Nach ihren Untersuchungen zur Vererbung von Chloroplastengen bei Raps und anderen *Brassica* spec. propagierten SCOTT und WILKINSON (1999) die Einführung transplastomer Rapslinien zur Reduzierung eines horizontalen Gentransfers. Von DANIELL (2002) wird die Produktion pollensteriler GVP-Linien vorgeschlagen, wie sie in der Rapszüchtung bereits verwendet werden (*barnase/ barstar*-System). Zur Samenproduktion benötigen diese GVP pollenfertile Restorerlinien, weshalb ein Ansatz für landwirtschaftliche Körnerfrüchte schwer umzusetzen ist. Neben der räumlichen Ausbreitungsfähigkeit des Pollens, ist vor allem die Überdauerungsfähigkeit des Samens für die Persistenz von Raps bedeutsam. So zeigten in England 23% der von WHITEHEAD und WRIGHT (1989) untersuchten Getreidebestände eine Verunreinigung mit Durchwuchsraps. Bei der Ernte ausgefallener Rapssamen kann u.U. viele Jahre im Boden überdauern, so dass Persistenzen von zwei bis zehn Jahren beschrieben wurden (SCHLINK 1998; GRUBER et al. 2001). Eine hohe Rate an Ausfallraps keimte bereits innerhalb der zwei Jahre, in denen die kontaminierten Agrarflächen der vorliegenden Arbeit beprobt wurden. Dabei konnte im Beprobungszeitraum keine wesentliche Reduzierung der Keimrate festgestellt werden. Auf den kontaminierten Agrarflächen wurde eine lange Auflaufperiode des Ausfallrapses beobachtet. Dies führte dazu, dass immer wieder einige Pflanzen erst nach der Herbizidbehandlung keimten. Diese Eigenschaft des Ausfallrapses, die seine Persistenz erhöht, wurde auch von LUTMAN (1993) beschrieben und auf verschiedene Wachstumsstöße zurück geführt.

Die Persistenz des Samens im Boden zeigt eine genotypische Abhängigkeit. Eine Wahl geeigneter Sorten kann daher der Bildung einer Samenbank entgegen wirken (SCHLINK 1994; LOPEZ-GRANADOS und LUTMAN 1998; GRUBER et al. 2001). Dabei wird die Summe aller keimfähigen Samen im Boden als Samenbank bezeichnet (LINDER und SCHMITT 1994). Nach ersten Untersuchungen zeigten GV-Rapsvarianten im Boden die gleiche (ROLLER et al. 2002) oder eine etwas schlechtere Persistenz als konventionelle Sorten (HAILS et al. 1997; GRUBER et al. 2001). Über die Persistenz der in dieser Arbeit untersuchten Rapsorte 'Hyola' gibt es in der Literatur keine Angaben. Im schlimmsten Fall ist jedoch mit einer langjährigen Persistenz zu rechnen. Ein sinnvolles Zuchtziel zur Reduzierung der Samenbank sind daher GV-Rapsorten, die widerstandsfähiger gegen Samenausfall bei der Ernte sind (PETERSEN et al. 1996). DANIELL (2002) schlagen die Entwicklung von GVP-Linien mit sterilen Samen vor, um ein unkontrolliertes Auflaufen zu verhindern. KUVSHINOV et al. (2001) entwickelten bereits GVP-Linien mit sterilen Samen, deren Keimfähigkeit durch eine spezifische Hitzeinduktion wieder hergestellt werden kann. Von KONING et al. (1992) wurde für GV-Raps ein System zur Hemmung der Embryoentwicklung hergestellt. Eine Restauration dieser Entwicklungshemmung wurde jedoch noch nicht vorgenommen.

Landwirtschaftliche Parameter

Die Verbreitung von Rapspollen kann vom Landwirt kaum beeinflusst werden. Um eine Ausbreitung des Rapspollens über Windverdriftung zu vermeiden, sind im neuen GenTG Abstandsflächen und Schutzhecken als mechanische Barrieren vorgeschrieben (BIOSICHERHEIT 2004c). Dem Landwirt obliegt vor allem die Pflicht, Mindestabstände zu kreuzungskompatiblen Kulturen einzuhalten. Derzeit darf transgener Raps in Deutschland noch nicht kommerziell angebaut werden. In den EU-Ländern werden für Raps Sicherheitsabstände zur nächsten kreuzungskompatiblen Kultur von 200 m (Belgien, Niederlande) bis 500 m (Deutschland) diskutiert (LINDENMEYER 1996). Nach den geringen Befruchtungserfolgen von GV-Rapspollen in diesen Entfernungen (vgl. Kapitel 4.2.2, Genotyp) dürften diese Abstände genügen, um in pollenfertilen Nachbarbeständen die kennzeichnungspflichtige Schwelle von 0,9% Transgenanteil zu unterschreiten. Negative Auswirkungen auf die Menge von Ausfallsamen haben ungleichmäßig abreifende Bestände und eine zu späte Ernte (BOWERMAN 1984). Bei Raps und Rübsen wurden Ausfallraten von 10 - 400 kg/ha bzw. bis zu 10 000 Körner pro m² berichtet (CUSSANS 1978; VERA et al. 1987; PRICE et al. 1996). Ein verlängerter Schneidbalken des Mähdeschers und die Verwendung von Seitenmessern verringern die Verluste (SPIESS 1986; PEKRUN et al. 1998a). Die hohen Ausfallraten konnten in Untersuchungen im

Rahmen dieses Projektes bestätigt werden (WESTERMEIER 2003). Dies ist wahrscheinlich auf den praxisunüblichen Einsatz von Parzellenmähdreschern mit kleiner Schnittbreite zurückzuführen. Der durchschnittliche Verlust auf Rapspraxisflächen liegt nach GULDEN et al. (2003) bei etwa 6% der Ernte bzw. 3 000 Samen pro m². Durch geeignete Sortenwahl und eine gute landwirtschaftliche Praxis lässt sich die Ausfallrate erheblich senken. Grundsätzlich wird empfohlen, die Ernte in den Morgen- und Abendstunden bei relativen Luftfeuchten über 60% durchzuführen und während der Mittagszeit zu vermeiden (PRICE et al. 1996; SPIESS 1986).

Die Bildung einer Samenbank kann durch geeignete Maßnahmen minimiert werden (PEKRUN und LUTMAN 1998). Spätestens drei Wochen nach der Ernte wird die morphologische Reife des Rapssamens erreicht. In dieser Zeit trocknen ausgefallene Samen ab, die primäre Keimruhe wird abgebaut und der Samen ist keimfähig (FUCHS 1987). Die Rate dormanzfähiger Samen kann daher drastisch reduziert werden, wenn der Samen nach der Ernte für ca. vier Wochen auf der Ackeroberfläche belassen und nicht in den Boden eingearbeitet wird. Eine tiefe Bodenbearbeitung ist zu vermeiden und Stoppel sollen in möglichst großem zeitlichen Abstand zur Ernte umgebrochen werden (LUTMAN 1993). Drei der fünf Agrarflächen, die in dieser Arbeit beprobt wurden, waren direkt nach der Ernte der kontaminierten Kultur gepflügt und zwei lediglich gegrubbert worden. Durch den Pflug erfolgt eine Einarbeitung des Samens in tiefe Bodenschichten, was zur Entwicklung einer ausgeprägten Keimruhe führen kann, während welcher der Rapssamen über mehrere Jahre keimfähig bleibt (FUCHS 1987; SCHLINK 1989). Im Untersuchungszeitraum zeigte sich noch kein offensichtlicher Unterschied zwischen der Keimrate der gepflügten und gegrubberten Flächen. Unterschiede in der Keimrate werden möglicherweise erst nach mehreren Jahren und erneutem Umpflügen deutlich, da eine Lichtinduktion nach BOWERMAN (1993) die Keimung dormanter Samen stimuliert. Nach Untersuchungen von ROLLER et al. (2003) kann durch Striegeln des Bodens im Anschluss an die Ernte bereits 56% des Rapssamens zum Auflaufen gebracht werden, durch eine Behandlung mit dem Kultivator 30%, mit dem Pflug dagegen nur 1%. Eine flache Bodenbearbeitung trägt u.U. auch zur Reduzierung mehrfach herbizidresistenter Pflanzen bei. So war in Untersuchungen von DIETZ-PFEILSTETTER und ZWERGER (2003) eine nicht-wendende Bodenbearbeitung zur Eliminierung doppeltresistenter Ausfallrapspflanzen ausreichend.

GARRETT und ORSON (1989) wiesen nach, dass die Auflauftrate von Rapssamen um so höher ist, je näher er sich an der Bodenoberfläche befindet. Die Entwicklung einer Langzeitpersistenz verhält sich umgekehrt, tief im Boden vergrabene Samen überdauern länger als flach eingearbeitete (PEKRUN et al. 1998b). Entscheidend hierfür sind der steigende Sauerstoffmangel und die relativ gleichmäßige Temperatur mit zunehmender Tiefe (FUCHS 1987).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines bayerischen Sicherheitsforschungsprojektes für gentechnisch veränderte Pflanzen (GVP) mit dem Ziel der Entwicklung von qualitativen und quantitativen PCR-Verfahren für die herbizidtolerante Rapslinie 'Falcon GS40/90' durchgeführt.

Für die quantitative Bestimmung von Transgenanteilen wurde die Real Time PCR-Methode eingesetzt, die durch Einführung fluoreszenzmarkierter Sonden eine Quantifizierung der Zielsequenz erlaubt. Als Zielsequenz zur Sichtung auf GVP diente die zur Herstellung transgener Pflanzen häufig eingesetzte Sequenz des 35S-Promotors (P-35S). Wegen der höheren Empfindlichkeit wurde hierfür ein Real-Time PCR Assay abgeleitet. Die detektierbare GVP-Palette umfasste die LibertyLink[®]-Linien (LL) von Raps ('Falcon GS40/90'), Mais ('T25') und Zuckerrübe ('T120-7') sowie die Bt-Maislinien 'MON810' und 'Bt176'.

Bislang publizierte Real-Time PCR Systeme zum Nachweis der LL-Rapslinie 'Falcon GS40/90' beruhen auf einzelnen Sequenzmotiven der integrierten Genkassette. Sequenzmotive die von Mikroorganismen abgeleitet sind, wie der P-35S implizieren jedoch das Risiko falschpositiver Ergebnisse und sind zur Bestimmung von GVP-Anteilen nur bedingt geeignet. In dieser Arbeit wurden deshalb je ein qualitativer und ein quantitativer LL-Konstrukt PCR Assay zur Detektion der Übergangsregion vom P-35S zum Phosphinothricinacetyltransferase-Gen (*pat*) entwickelt. Eine Evaluierung dieser PCR Assays zeigte ihre selektive Spezifität für die LL-Linien 'Falcon GS40/90', 'T25' und 'T120-7'.

Die Normalisierung der Transgenanteile erfolgt in der GVP-Analyse über Real-Time PCR Referenzsysteme. In dieser Arbeit wurde das S-glucosyltransferase-Gen (*s_{gt}*) als *Brassica* spezifisches Referenzgen eingeführt, das sich aufgrund der niedrigen Kopienzahl im Genom als Zielsequenz gut eignete. Der abgeleitete *s_{gt}* Real Time PCR Assay war sehr empfindlich und zeigte gleichmässige und robuste Fluoreszenzsignale.

Hinsichtlich der neuen EU-Grenzwerte für unbeabsichtigte GVP-Beimischungen in Lebensmittel- und Futterprodukten war die Bestimmung der Verfahrensempfindlichkeit ein wichtiges Thema der vorliegenden Arbeit. Die Schätzung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NG und BG) erfolgte mit Hilfe von DNA-Kalibrierstandards unter Anwendung von DIN-Normen. Dabei wurden Vertrauensintervalle (VI) abgeleitet, in denen die Kopienzahl der NG bzw. BG mit einer mindestens 95%igen Wahrscheinlichkeit liegt. Alternativ erfolgte eine exakte Berechnung dieser Grenzwerte über Intrapolation entlang einer Regressionsgeraden. Für den quantitativen LL-Konstrukt PCR Assay schwankten die vom VI abgeleiteten NG

bzw. BG zwischen 2,8 - 26 und 21- 279 Kopien. Die exakt bestimmten NG und BG lagen dagegen bei nur 1,3 - 1,6 und 4,0 - 4,9 Kopien. Unter Einbeziehung des *Brassica* spezifischen *s_gt*-Gen Referenz PCR Assays ließen sich relative NG und BG ableiten. Für die aus den VI abgeleiteten NG und BG ergaben sich relative NG und BG von 0,01% bzw. 0,01 -0,10% und für die exakt bestimmten NG und BG von 0,001% bzw. 0,001-0,002%. Damit war die exakte Bestimmung der Grenzwerte um ca. das zehnfache empfindlicher als die Ableitung über VI. Die exakte NG stellt die maximal erreichbare Nachweisempfindlichkeit der PCR-Analyse dar. Im Hinblick auf die Unsicherheiten vorhergehender Analyseschritte sollte die exakte NG mit einem fünf- bis zehnfachen Sicherheitsfaktor multipliziert werden.

Neben der Nachweisempfindlichkeit standen die Richtigkeit und Robustheit der quantifizierten Ergebnisse im Mittelpunkt der Validierung. Zu diesem Zweck wurden verschiedene genomische und plasmidale Kalibrierstandards entwickelt und evaluiert. Als Maß diente die Wiederfindungsfunktion (W_F). Die W_F wurde eingesetzt um das Verhältnis von eingesetzten zu quantifizierten Kopien zu berechnen. Stimmen beide absolut überein nimmt die Steigung der W_F den Idealwert 1,00 an. Es zeigte sich, dass genomische und plasmidale DNA-Standards die durch serielle Mischung transgener DNA mit DNA der konventionellen isogenen Linie hergestellt wurden mit 1,07 bzw. 1,03 die besten W_F -Steigungen erreichten. Wasser verdünnte genomische und plasmidale DNA-Standards ohne Hintergrund-DNA zeigten schlechtere W_F -Steigungen von 1,34 bzw. 0,84. Analog zu kommerziell angebotenen Kalibrierstandards, wurden zudem Standards durch eine Mischung konventioneller und transgener Samen hergestellt. Diese Standards zeigten ebenfalls eine schlechte W_F -Steigung von 1,32. Plasmidale Kalibrierstandards mit genomischer Hintergrund-DNA besitzen somit das Potential für die Entwicklung neuer GVP-Standards, die nicht nur eine exakte Quantifizierung erlauben, sondern auch einfach herzustellen, zu kombinieren und zu reproduzieren sind.

Mit Hilfe der entwickelten Real-Time PCR Assays wurden Mischproben von fünf bayerischen Agrarflächen analysiert, auf denen im Jahr 2000 versehentlich transgen kontaminiertes Rapssaatgut ausgesät worden war. Es zeigte sich, dass die vorgestellte Methodik auch zur Bestimmung sehr geringer Transgenanteile in Mischproben gut geeignet ist. Selbst zwei Jahre nach Anbau des GVP-Rapses konnte auf einigen Agrarflächen immer noch herbizidtoleranter Ausfallraps mit dem *pat*-Gen (bis zu 0,07%) bzw. *epsps*-Gen (RoundupReady[®]-Toleranz, bis zu 0,33%) nachgewiesen werden. Die Einflüsse auf die Persistenz von herbizidtolerantem Raps in der landwirtschaftlichen Umwelt werden diskutiert.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- ANONYMOUS (1998) Molekularbiologische Methoden. Schweizer Lebensmittelbuch 52B: 1-40
- ANONYMUS (2001) Methodes validated by interlaboratory studies. Intergovernmental Task Force on Food Derived from Biotechnology: <http://www.osservaogm.it/pdf/Val-methodsinterlab.pdf>
- ANONYMUS (2003) Bildung von Eizelle, Pollen, Embryo und Endosperm. Universität Hamburg: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e48/48d.htm>
- AHMED F E (2002) Detection of genetically modified organisms in foods. Trends Biotechnol 20: 215-222
- ALARY R, SERIN A, MAURY D, JOUIRA H B, SIRVEN J-P, GAUTIER M-F, JOUDRIER P (2002) Comparison of simplex and duplex real-time PCR for the quantification of GVO in maize and soybean. Food Control 13: 235-244
- AL-KAFF N S, KREIKE M M, COVEY S N, PITCHER R, PAGE A M, DALE P J (2000) Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter-regulated transgene. Nature Biotechnol 18: 995-999
- ALLMANN M, CANDRIAN U, HÖFELEIN C, LÜTHY J (1993) Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. Z Lebensm Unters Forsch 196: 248-251
- ALLMANN M, HÖFELEIN C, KÖPPEL E, LÜTHY J, MEYER R, NIEDERHAUSER C, WEGMÜLLER B, CANDRIAN U (1995) Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. Res Microbiol 146: 85-97
- ANKLAM E, GADANI F, HEINZE P, PIJENBURG H, VAN DEN EEDE G (2002) Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. Eur Food Res Technol 214: 3-26
- ARLORIO M, COÏSSON J D, CERETI E, TRAVAGLIA F, CAPASSO M, MARTELLI A (2003) Polymerase chain reaction (PCR) of puroindoline b and ribolomal/puroindoline b multiplex PCR for the detection of common wheat (*Triticum aestivum*) in Italian pasta. Eur Food Res Technol 216: 253-258
- ARUMUGANATHAN K, EARLE E D (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol Biol Rep 9: 208-218
- AUSUBEL F M, BRENT R, KINGSTON R E, MOORE D D, SEIDMAN J G, SMITH J A, STRUHL K (1999) Short protocols in molecular biology. 4 ed. Wiley, New York
- BARTSCH D (2002) Erkenntnisse aus der bisherigen Begleitforschung und Perspektiven für ein zukünftiges Monitoring von transgenen Pflanzen. In: Forschungsschwerpunkt Biotechnologie und Pflanzenzüchtung 18. Kolloquium. Stuttgart-Hohnheim, 21.-22. Nov. 2002: 11
- BASSLER H A, FLOOD S J A, LIVAK K J, MARMARO J, KNORR R, BATT C A (1995) Use of fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. App Environ Microb 61: 3724-3728
- BATES A J, TAYLOR J A E (2001) Scorpion ARMS primers for SNP real-time PCR detection and quantification of *Pyrenophora teres*. Mol Plant Path 2: 275-280

- BAUER F, HERTEL C, HAMMES W P (1999) Transformation of *Escherichia coli* in foodstuffs. *Syst Appl Microbiol* 22: 161-168
- BAUER T, WELLER P, HAMMERS W P, HERTEL C (2003) The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *Eur Food Res Technol* 217: 338-343
- BECKER H C, KARLE R, HAN SS (1992) Environmental variation for outcrossing rates in rapeseed (*Brassica napus*). *Theor Appl Genet* 84: 303-306
- BfR Bundesinstitut für Risikobewertung (2003) Kennzeichnung und Rückverfolgbarkeit genetisch veränderter Lebensmittel und Futtermittel. <http://www.bfr.bund.de/cd/2394>
- BERDAL K G, HOLST-JENSEN A (2001) Roundup Ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GVO analyses. *Eur Food Res Technol* 213: 432-438
- BIOLOGISCHE BUNDESANSTALT (1993) Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz - GenTG). <http://www.bba/gentech.gentg.pdf>
- BIOLOGISCHE BUNDESANSTALT (2003) Anträge zur Freisetzung von GVO: Eingeführte Eigenschaften. BBA: <http://www.bba.de/gentech/tab3.htm>
- BIO SICHERHEIT (2002) Verbot der Antibiotikaresistenz-Marker? <http://biosicherheit.de/gentransfer/42.doku.html>
- BIO SICHERHEIT (2003) Saatgut: Kommission lenkt ein. <http://biosicherheit.de/aktuell/237.doku.html>
- BIO SICHERHEIT (2004a) Wenig Spielraum für nationale Sonderwege. <http://biosicherheit.de/aktuell/>
- BIO SICHERHEIT (2004b) Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) <http://biosicherheit.de/webverzeichnis/behoerden/deutschland>
- BIO SICHERHEIT (2004c) Kompromiss im Kabinett. <http://biosicherheit.de/aktuell/255.doku.html>
- BIRNBIOM H.G.C, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acid Res* 7: 1516-1522
- BLOCK A, SCHWARZ G (2003) Validation of different genomic and cloned DNA calibration standards for construct-specific quantification of LibertyLink in rapeseed by real-time PCR. *Eur Food Res Technol* 216: 421-427
- BOJSEN K, DONALDSON I, HALDRUP A, JOERSBOE M, KREISBERG J D, NIELSEN J, OKKELS F T, PETERSEN S G (1993) A positive selection system for transformed eukaryotic cells based on mannose or xylose utilization. Patent WO 94/20627
- BONFINI L, HEINZE P, KAY S, VAN DEN EEDE G (2001) Review of GVO detection and quantification techniques. JRC European Commission: <http://www.osservaogm.it/pdf/JRCReview.pdf>
- BONNET G, TYAGI S, LIBCHABER A, KRAMER F R (1999) Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *Pro Natl Acad Sci USA* 96: 6171-6176
- BOUCHIE A (2002) Organic farmers sue GVO producers. *Nature Biotechnol* 20: 210
- BOWERMAN P (1984) Comparison of harvesting methods of oilseed rape. *Asp Appl Biol* 6: 157-165
- BOWERMAN P (1993) Effects of cultivation upon volunteer oilseed rape. *Asp Appl Biol* 35: 28-36

- BRANDT P (2000) Monitoring von gentechnisch veränderten Pflanzen. RKI Internet-Forum: <http://www.rki.de/GENTEC/FORUM/FORUM.HTM>
- BRÄUTINGAM M, HERTEL C, HAMMES W (1997) Evidence for natural transformation of *Bacillus subtilis* in foodstuffs. FEMS Microbiol Lett 155: 93-98
- BRETT G M, CHAMBERS S J, HUANG L, MORGAN M R A (1999) Design and development of immunoassay for detection of proteins. Food Control 10: 401-406
- BRODMANN P D, ILG E C, BERTHOUD H, HERRMANN A (2002) Real-Time quantitative polymerase chain reaction methods for four genetically modified maize varieties and maize DNA content in food. J AOAC Int 85: 646-653
- BRODMANN P, EUGSTER A, HÜBNER P, MEYER R, PAULI U, VÖGELI U, LÜTHY J (1997) Nachweis gentechnisch veränderter Roundup ReadyTM Sojabohnen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Mitt Gebiete Lebensm Hyg 88: 722-731
- BRODMANN P und NICHOLAS G (1999) Saatgut: Kontamination mit GVO. Kurzbericht. http://www.kantonslabor-bs.ch/infos_berichte.cfm?Labor.Command=detail&Labor.Jahr=1999&Labor.ID=52
- BROOKES G (2002) Identity preservation of genetically modified organisms in the food chain: requirements, methods, and costs. J AOAC Int 85: 762-763
- BROWN J, BROWN A P (1996) Gene transfer between canola (*Brassica napus* L. and *B. campestris* L.) and related weed species. Ann App Bio 129: 513-522
- BRUNNERT H-J, SPENER F, BÖRCHERS T (2001) PCR-ELISA for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified Roundup Ready soybeans. Eur Food Res Technol 213: 366-371
- BRYANT J, LEATHER S (1992) Removal of selectable marker genes from transgenic plants: needless sophistication or social necessity? Trends Mol Biol 10: 274-275
- BUNDESMINISTERIUM FÜR GESUNDHEIT UND FRAUEN (2003) Gründe für die österreichische Entscheidung, den Gebrauch und Verkauf von gentechnisch veränderten Maislinien, notifiziert von CIBA-GEIGY in Übereinstimmung mit der Richtlinie 90/220/EWG und zugelassen von Frankreich am 5.2.1997, zu verbieten. <http://www.gentechnik.gv.at/gentechnik/gesetz/BegrueundungCibamais.html>
- BURNS M, SHANAHAN D, HERNAN V, HARRIS N (2003) Quantitative event-specific multiplex PCR detection of Roundup Ready soya using LabChip technology 216: 428-433
- CALLAHAN P (2000) Genetically altered protein is found in still more corn. Wall Street Journal Nov 22: B5
- CANDRIAN U (1995) Polymerase chain reaction in food microbiology. J Microbiol Meth 23: 89-103
- CAPLIN B E, RASMUSSEN RANDY P, BERNARD P S, WITTEWIT C T (1999) The most direct way to monitor PCR amplification for quantification and mutation detection. Biochemica 1: 5-8
- CÉPEDES A, CARCIA T, CARRERA E, CONZÁLEZ I, FERNÁNDEZ A, FERNÁNDEZ P, MARTÍN R (1999) Identification of sole (*Solea solea*) and greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR amplification of the 5S rDNA gene. J Agr Food Chem 47: 1046-1050

- CHAMBERLAIN D, STEWART C N JR (1999) Transgene escape and transplastomics. *Nature Biotechnol* 17: 330-331
- CHAMBERS V H (1968) Pollen collected by species of *Andrena* (Hymenoptera: Apidae). *Pro R ent Soc Lond* 34: 155-160
- CHEVRE A M, EBER F, DARMENCY H, FLEURY A, PICAULT H, LETANNEUR J C, RENARD M (2000) Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under normal agronomic conditions. *Theor Appl Genet* 100: 1233-1239
- CHIKWAMBA R, MURRAY J MC, SHOU H, FRAME B, PEGG S E, SCOTT P, MESON H, WANG K (2002) Expression of a synthetic *E. coli* heat-labile enterotoxin B sub-unit (LT-B) in maize. *Mol Breeding* 10: 253-265
- CHIUEH L-C, CHEN Y-L, HWA J-H, SHIH D Y-C (2001) Detection of four types of genetically modified maize by polymerase chain reaction and immuno-kit methods. *J Drug Anal* 9: 50-57
- CRESSWELL J E, DAVIES T W, PATRICK M A, RUSSELL F, PENNEL C, LAHOUBI M VICOT M (2003) *Brassica napus* is aerodynamically unsuited to cross-pollination by wind. In: The 1st European Conference on the Co-existence of Genetically Modified Crops with Conventional and Organic Crops, GMCC-03. DK-Slagelse, 13-14 Nov.: 206
- CUSSANS C W (1978) The problem of volunteer crops and some possible means of their control. *Proc Brit Crop Prot Conf - Weeds*: 3 915-921
- DALE P J, IRWIN J A, SCHEFFLER J A (1993) The experimental and commercial release of transgenic crop plants. *Plant Breeding* 111: 1-22
- DANIELL H (1998) Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnol* 16: 345-348
- DANIELL H (2002) Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nature Biotechnol* 20: 581-843
- DEL VECCHIO A J (1996) High-laurate canola. *INFORM* 7: 230-243
- DE SILVA J, LOADER N M, JARMAN C, WINDUST J H C, HUGHES S G, SAFFORD R (1990) The isolation and sequence analysis of two seed-expressed acryl carrier protein genes from *Brassica napus*. *Plant Mol Biol* 14: 537-548
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMIERUNG (1990) Beiblatt zu DIN 53804-1. Teil 1: Statistische Auswertungen. Meßbare (kontinuierliche) Merkmale 1-16
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (1994) DIN 32645. Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze 1-10
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (2002) DIN 53804-1. Statistische Auswertungen. Teil 1: Kontinuierliche Merkmale:1-19
- DIEHL F, GRAHLMANN S, BEIER M, HOHEISEL J D (2001) Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *Nucl Acids Res* 29: 1-5
- DIETZ-PFEILSTETTER A, ZWERGER P (1999) Untersuchungen zur Auskreuzung von Herbizidresistenzgenen beim großflächigen Anbau von Rapspflanzen mit unterschiedlichen Herbizidresistenzen. *Biologische Sicherheit: BMBF-Statusseminar, Braunschweig*: 21-30

- DIETZ-PFEILSTETTER A, ZWARGER P (2003) Pollen and seed dispersal during the large scale cultivation of transgenic oilseed rape. In: The 1st European Conference on the Co-existence of Genetically Modified Crops with Conventional and Organic Crops, GMCC-03. DK-Slagelse, 13-14 Nov.: 97-99
- DREXLER H H S, SCHEFFLER J A, HEINZ E (2003) Evaluation of putative seed-specific promoters for *Linum usitatissimum*. Mol Breeding 11: 149-158
- DRÖGE W, BROER I, PÜHLER A (1992) Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. Planta 187: 142-151
- EASTHAM K und SWEET J (2002) Genetically modified organisms (GVOs): The significance of gene flow through pollen transfer. Environ Issue Rep 28: 1-54
- EG-KOMMISSION (2001) Vorschlag für eine Verordnung 2001/0173 vom 25. Juli 2001 über genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel. KOM (2001) 425, 2001/0173 (COD): <http://europa.eu.int/>
- EG-KOMMISSION (2002) Verordnung 178/2002/EG vom 28. Januar 2002 zur Festlegung allgemeiner Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften. L31: <http://europa.eu.int/>
- EHLERS B, STRAUCH E, GOLTZ M, KUBSCH D, WAGNER H, MAIDHOF H, BENDIEK J, APPEL B, BUHK H-J (1997) Nachweis genetisch Veränderungen in Mais mittels PCR. Bundesgesundheitsblatt 4: 118-121
- EICKWORT G C, GINSBERG H S (1980) Foraging and mating behavior in Apoida. Ann Rev Ent 25: 421-446
- EINSPANIER R (2001) Quantifying genetically modified material in food: searching for a reliable certification. Eur Food Res Technol 213: 415-416
- EMIROGLU S H, INCEKARA F, PLARRE W, RÖBBELEN G, SCHUSTER W (1985) Öl- und Faserpflanzen. In: HOFFMANN W, MUDRA A, PLARRE (Eds) Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen 2 (2) Paul Parey, Berlin: 289-349
- EUROPEAN COUNCIL (1990) Council Directive on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms (90/220 EEC). The Council Directive of the European Communities. <http://www.biosafety.be/GB/Dir.Eur.GB/Del.Rel./90.220/TC.html>
- EUROPEAN COUNCIL (1997) No 258/97/EC Regulation Council directive of 27. January 1997 on the novel foods and food ingredients. L043: 0001-0006 http://europa.eu.int/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg.
- EUROPEAN COMMISSION (2001) Kommission verbessert Regeln für Kennzeichnung und Rückverfolgbarkeit von GVO in Europa, die dem Verbraucher die Wahl lassen und den Schutz der Umwelt sichern. http://www.eu.int/rapid/start/cgi/guesten.ksh?p_action IP/01/1095
- EUROPEAN COUNCIL (2001a) 2001/18/EC European Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC - Commission Declaration. Official Journal of the European Community. L106: 0001-0039. http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2001/l_106/l_10620010417en00010038.pdf

- EUROPEAN COUNCIL (2001b) Vorschlag für eine Verordnung des Europäischen Parlaments und des Rates über die Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung genetisch veränderter Organismen und über die Rückverfolgbarkeit von aus genetisch veränderten Organismen hergestellten Lebensmitteln und Futtermitteln sowie zur Änderung der Richtlinie 2001/18/EG. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft. C 304E: 327-330
<http://europa.eu.int/>
- FACCIOTTI M T, BERTAIN P B, YUAN L (1999) Improved stearate phenotype in transgenic canola expressing a modified acyl-acyl carrier protein thioesterase. *Nature Biotechnol* 17: 593-597
- FAN C, PLAXCO K W, HEEGER A J (2003) Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA. *Pro Natl Acad Sci USA* 100: 9134-9137
- FEINBERG A P, VOGELSTEIN B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13
- FERIOTTO G, GARDENGI S, BIANCHI N, GAMBARI R (2003) Quantitation of Bt-176 maize genomic sequences by surface resonance-based biospecific interaction analysis of multiplex polymerase chain reaction. *J Agr Food Chem* 51: 4640-4646
- FLAVELL R B, DART E, FUCHS R L, FRALEY R T (1992) Selectable marker genes: safe for plants? *Bio/Techn* 10: 141-144
- FOE (Friends of the earth for the planet for people) (2000) The 'accidental' release of GM oilseed rape into the UK countryside. <http://www.foe.co.uk/resource/briefings/contaminated-gm-crops.pdf>
- FUCHS H (1987) Wie lange bleiben Raps-Samen im Ackerboden lebensfähig? *Raps* 5: 140-141
- FUCHS R L, HEEREN R A, GUSTAFSON M E, ROGAN G J, BARTNICKI D E, LEIMGRUBER R M, FINN R F, HERSHMAN A, BERBERICH S A (1993) Purification and characterization of microbially expressed neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein and its equivalence to plant expressed protein. *Bio/Techn* 11: 1537-1542
- GAL S, PISAN B, HOHN T, GRIMSLEY N, HOHN B (1991) Genomic homologous recombination in *planta*. *EMBO J* 10: 1571-1578
- GAO H-W, ZHANG D-B, LIANG C-Z (2003) Multiplex polymerase chain reaction method for detection of bovine materials in foodstuffs. *J AOAC Int* 86: 764-767
- GARRETT H J, ORSON J H (1989) Depth and date of emergence of volunteer oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its control with herbicides in peas, beans, potatoes and sugar beet. *Proc Brit Crop Prot Conf - Weeds* 7C-2: 811-816
- GEN-ETHISCHES NETZWERK (1999) Versuch 6786-01-0107.
<http://www.gen-ethisches-netzwerk.de/gen/html/freisetz/antraege/6786-01-0107.html>
- GIGLIO S, MONIS P T, SAINT C P (2003) Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucl Acids Res* 31: e136
- GILLILAND G, PERRIN S, BLANCHARD K, BUNN H F (1990) Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantification by competitive polymerase chain reaction. *Pro Natl Acad Sci USA* 87: 2725-2729

- GRUBER S, PEKRUN C, CLAUPEIN W (2001) Genotypische Variation der Entwicklung sekundärer Dormanz bei Raps. *Mitt Ges Pflanzenbauwiss* 13: 250-251
- GULDEN R H, SHIRTLIFFE S J, THOMAS A G (2003) Harvest losses of canola (*Brassica napus*) cause large seedbank inputs. *Weed Sci* 51: 83-86
- HAILS R S, REES M, KOHN D D, CRAWLEY M J (1997) Burial and seed survival in *Brassica napus* subsp. *oleifera* and *Sinapsis arvensis* including a comparison of transgenic and non-transgenic lines of the crop. *Proc R Soc Lond B* 264: 1-7
- HALDRUP A, PETERSEN S G, OKKELS F T (1998) The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as selection agent. *Plant Mol Biol* 37: 287-296
- HARDEGGER M, BRODMANN R, HERRMANN A (1999) Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR. *Eur Food Res Technol* 209: 83-87
- HARMS H (2003) Persönliche Mitteilung. Bayer CropScience Deutschland
- HARTL D L, OCHMAN H (1996) Invertase polymerase chain reaction. In: HAWOOD A J (Eds) *Methods in Molecular Biology* (58) Human Press. Totowa: 293-301
- HASLBERGER A G (2000) Monitoring and labeling for genetically modified products. *Science* 287: 431-432
- HASLBERGER A (2001) GVO contamination of seeds. *Nature Biotechnol* 19: 613
- HASSAN-HAUSER C, MAYER W, HÖRTNER H (1998) Detection of the starch modifying gbss-antisense construct in transgenic potatoes. *Z Lebensm Unters Forsch* 206: 83-87
- HELLEBRAND M, NAGY M, MÖRSEL J-T (1998) Determination of DNA traces in rapeseed oil. *Z Lebensm Unters Forsch* 206: 237-242
- HEMMER W, PAULI U (1998) Labelling of food products derived from genetically engineered crops. *Eur Food Law Rev* 8: 27-38
- HERNÁNDEZ M, ESTEVE T, PRAT S, PLA M (2004) Development of real-time PCR systems based on SYBR[®] Green I, Amplifluor[™] and TaqMan[®] technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21. *J Cereal Sci* 39: 99-107
- HERNÁNDEZ M, PLA M, ESTEVE T, PRAT S, PUIGDOMÈNECH P, FERRANDO A (2003) A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard[®] based on the 3'-transgene integration sequence. *Transgenic Res* 12: 179-189
- HERNÁNDEZ M, RÍO A, ESTEVE T, PRAT S, PLA M (2001) A rapeseed-specific gene, acetyl-CoA carboxylase, can be used as a reference for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes from mixed food samples. *J Agr Food Chem* 49: 3622-3627
- HERTZBERG M, SIEVERTZON M, ASPEBORG H, NILSSON P, SANDBERG G, LUNDEBERG J (2001) cDNA microarray analysis of small plant tissue samples using a cDNA tag target amplification protocol. *Plant J* 25: 585-591
- HIRD H, POWELL J, JOHNSON M-L, OEHLISCHLAGER S (2003) Determination of percentage of RoundUp Ready soya in soya flour using real-time polymerase chain reaction: interlaboratory study. *J AOAC Int* 86: 66-70

- HO M-W, RYAN A, CUMMINS J (1999) Cauliflower mosaic viral promoter - A Recipe for a Disaster? *Microbial Ecology in Health and Disease* 11: 4
- HODGSON J (1999) EC says 1% is acceptable GVO 'contamination'. *Nature Biotechnol* 17: 1155-1156
- HOECHST (2004) *Gene, Zellen, Allianzen: Landwirtschaft*.
<http://www.archiv.hoechst.de/english/index.html>
- HOHN B, LEVY A A, PUCHTA H (2001) Elimination of selection markers from transgenic plants. *Curr Opin Biotech* 12: 139-143
- HÖHNE M, SANTISI C R, MEYER R (2002) Real-time multiplex PCR: An accurate method for the detection and quantification of 35S-CaMV promoter in genetically modified maize-containing food. *Eur Food Res Technol* 215: 59-64
- HOLCK A, VAITILINGON M, DIDIERJEAN L, RUDI K (2002) 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified MON810 MaisGard maize. *Eur Food Res Technol* 214: 449-453
- HOLLAND P, ABRAMSON R D, WATSON R, GELFAND D H (1991) Detection of specific polymerase chain reaction products by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7276-7280
- HOLST-JENSEN A, RONNING S B, LOVSETH A, BERDAL K G (2003) PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms. *Eur Food Res Technol*
- HÖRTNER H (1997) Nachweismöglichkeiten gentechnisch hergestellter Lebensmittel. *Ernährung* 21: 443-446
- HOWELL W M, JOBS M, GYLLENSTEN U, BROOKES A J (1999) Dynamic allele-specific hybridization. *Nature Biotechnol* 17: 87-88
- HU S, BELACHEW B, CHEN L, HUANG H, ZHANG J (1999) Fluorescence-based single-tube assays to rapidly detect human gene mutation. *Stratagene Newsletter* 13: 71-73
- HÜBNER P, WAIBLINGER H-U, PIETSCH K, BRODMANN P (2001) Validation of PCR methods for the quantification of genetically modified plants in food. *J AOAC Int* 84: 1855-1864
- HUPFER C, HOTZEL H, SACHSE K, ENGEL K-H (1997) Detection of genetically modified insect-resistant Bt maize by means of polymerase chain reaction. *Z Lebensm Unters Forsch* 205: 442-445
- HUPFER C, HOTZEL H, SACHSE K, ENGEL K-H (1998) Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Z Lebensm Unters Forsch* 206: 203-207
- HUPFER C, HOTZEL H, SACHSE K, MOREANO F, ENGEL K-H (2000) PCR-based quantification of genetically modified Bt maize: single-competitive versus dual-competitive approach. *Eur Food Res Technol* 212: 95-99
- HUPFER C, MAYER J, HOTZEL H, SACHSE K, ENGEL K-H (1999) The effect of ensiling on PCR-based detection of genetically modified Bt maize. *Eur Food Res Technol* 209: 301-304
- HURST C D, KNIGHT A, BRUCE I J (1999) PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs. *Mol Breeding* 5: 579-586

- IAMTHAM S, DAY A (2000) Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nature Biotechnol* 18: 1172-1176
- INSTITUTE OF SCIENCE IN SOCIETY (2000) The proposed decision to add Chardon LL (Aventis - T25 Mais) to the National List. <http://www.i-sis.org.uk/appeal.php>
- JAMES C (2002) Global status of commercialized transgenic crops: 2003. *ISAAA Briefs* 27: 1-24
- JANKIEWICZ A, BROLL H, ZAGON J (1999) The official method for the detection of genetically modified soybeans (German Food Act LMBG §35): a semi-quantitative study of sensitivity limits with glyphosate-tolerant soybeans (Roundup Ready) and insect-resistant Bt maize (Maximizer). *Eur Food Res Technol*: 77-82
- KAISER H (1947) Die Berechnung der Nachweisempfindlichkeit. *Spektrochim Acta* 3: 40-67
- KERLAN M C, CHÉVERE A M, EBER F, BARANGER A, RENARD M (1992) Risk assessment of out-crossing of transgenic rapeseed to related species: Interspecific seed production under optimal conditions with emphasis on pollination and fertilization. *Euphytica* 62: 145-153
- KHAN M S, MALIGA P (1999) Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nature Biotechnol* 17: 910-915
- KLAUS S M J, HUANG F-C, GOLDS T J, KOOP H-U (2004) Generation of marker-free plastid transformants using a transiently cointegrated selection gene. *Nature Biotechnol* 22: 225-229
- KLEPPE K, OHTSUKA E, KLEPPE R, MOLINEUX I, KHORANA H G (1971) Studies on polynucleotides. *J Mol Biol* 56: 341-361
- KNUTZON D S, THOMPSON G A, RADKE S E, JOHNSON W B, KNAUF V C, KRIDL J C (1992) Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2624-2628
- KOHLI A, LEECH M, VAIN P, LAURIE D A, CHRISTOU P (1998) Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7203-7208
- KOHLI A, LEECH M, VAIN P, LAURIE D A, CHRISTOU P, GRIFFITHS S, PALACIOS N, TWYMAN R M, VAIN P, LAURIE D A, CHRISTOU P (1999) Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *Plant J* 17: 591-601
- KOK E J, AARTS H J M, VAN HOEF A M A, KUIPER H A (2002) DNA-methods: Critical review of innovative approaches. *J AOAC Int* 85 : 797-800
- KONING A, JONES A, FILLATTI JJ, COMAIL L, LASSNER M W (1992) Arrest of embryo development in *Brassica napus* mediated by modified *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Plant Mol Biol* 18: 247-258
- KÖPPEL E, STADLER M, LÜTHY J, HÜBNER P (1997) Sensitive Nachweismethode für die gentechnisch veränderte Soyabohne "Roundup Ready". *Mitt Gebiete Lebensm Hyg* 88: 164-175
- KÖPPEL E, STADLER M, LÜTHY J, HÜBNER P (1998) Detection of wheat contaminations in oats by polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). *Z Lebensm Unters Forsch* 206: 399-403

- KROMIDAS S, GRUBER U, KLEIN W (1999) Validierung in der Analytik. Die Praxis der instrumentellen Analytik. Wiley-VCH. Weinheim: 172-180
- KRUSE M (2002) GVO-Verunreinigungen in konventionellem Saatgut: Schwellenwerte, Nachweisverfahren, Ergebnisse. 8.Kolloquium. Mündliche Mitteilung
- KRUSZEWKA I (2000) The modified east. The Ecologist.
http://www.findarticles.com/cf_O/m2465/mag.jhtml
- KUIPER H, NOTEBORN H P J M, KOK E J, KLETER G A (2002) Safety aspects of novel foods. Food Res Int 35: 267-271
- KUMAR A, RAKOW G, DOWNEY R K (1998) Genetic characterization of glufosinate-ammonium tolerant summer rape lines. Crop Sci 38: 1489-1494
- KUNZE I, EBNETH M, HEIM U, GEIGER M, SONNEWALD U, HERBERS K (2001) 2-Deoxy glucose resistance: a novel selection marker for plant transformation. Mol Breeding 7: 221-227
- KURIBARA H, SHINDO Y, MATSUOKA T, TAKUBO K, FUTO S, AOKI N, HIRAO T, AKIYAMA H, GODA Y, TOYODA M, HINO A (2002) Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. J AOAC Int 85: 1077-1089
- KUTYAVIN I V, AFONINA I A, MILLS A, GORN V V, LUKHATNOV E A, BELOUSOV E S, SINGER M J, WALBURGER D K, LOKHOV S G, GALL A A, DEMPCY R, REED M W, MEYER R B, HEDGPETH J (2000) 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. Nucl Acids Res 28: 655-661
- KUVSHINOV V, KOIVU K, KANERVA A, PEHU E (2001) Molecular control of transgene escape from genetically modified plants. Plant Sci 160: 517-522
- LAG (LÄNDERAUSSCHUB GENTECHNIK) (2001) Konzept für ein einheitliches Vorgehen bei der experimentellen gentechnischen Überwachung von GVO-Anteilen in konventionellen Saatgut.
<http://www.rki.de/GENTEC/UAM/SAATGUT.PDF>
- LAG (LÄNDERAUSSCHUB GENTECHNIK) (2003) Konzept zur Untersuchung von Saatgut auf Anteile gentechnisch veränderter Pflanzen.
<http://www.rki.de/GENTEC/UAM/SAATGUT.PDF>
- LAWSON H M 1993. Herbicide-tolerant crops - a weed scientist's view. Asp Appl Biol. 35: 37-43
- LEE L G, CONNELL C R, BLOCH W (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. Nucl Acids Res 21: 3761-3766
- LEE S I, KIM H U, LEE Y-H, SUH S-C, LIM Y P, LEE H-Y, KIM H-I (2001) Constitutive and seed-specific expression of maize lysine-feedback-insensitive dihydrodipicolinate synthase gene leads to increase free levels in rice seeds. Mol Breeding 8: 75-84
- LEFOL E, FLEURY A und DARMENCY H (1996) Gene dispersal from transgenic crops. II. Hybridization between oilseed rape and the wild hoary mustard. Sex Plant Reprod 9: 189-196
- LEHRMAN S (1999) GM backlash leaves US farmers wondering how to sell their crops. Nature 401: 107

- LENMAN M, FALK A, XUE J, RASK L (1993) Characterization of a *Brassica napus* myrosinase pseudogene: myrosinases are members of the BGA family of β -glycosidases. *Plant Mol Biol* 21: 463-474
- LEVIN R E (2003) Application of the polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in foods: A review of methodology. *Food Biotechnol* 17: 99-116
- LGL Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelrecht (2004) Gesetzliche Regelungen. <http://www.lgl.bayern.de/de/left/fachinformation/lebensmittelrecht/>
- LIN H-Y, CHIANG J-W, SHIH D Y-C (2001) Detection of genetically modified soybeans by PCR method and immunoassay kits. *J Food Drug Anal* 9: 160-166
- LIN H-Y, CHIUEH L-C, SHIH D Y-C (2000) Detection of genetically modified soybeans and maize by the polymerase chain reaction method. *J Food Drug Anal* 8: 200-207
- LINDAHL T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715
- LINDENMEYER J (1996) Safty Assessment. BATS (Biosicherheitsforschung und Abschätzung von Technikfolgen des Schwerpunktprorammes Biotechnologie) <http://ww.ch.embnet.org/BATS>
- LINDER C R, Schmitt J (1994) Assessing the risks of transgene escape through time and crop-wild hybrid persistence. *Mol Ecol* 3: 23-30
- LIPP M, ANKLAM E (2000) Validation of an immunoassay for detection and quantitation of a genetically modified soybean in food and food fractions using reference materials: interlaboratory study. *J AOAC Int* 83: 919-927
- LIPP M, BLUTH A, EYQUEM F, KRUSE L, SCHIMMEL H, VAN DEN EEDE G, ANKLAM E (2001) Validation of a method based on polymerase chain reaction of the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *Eur Food Res Technol* 212: 497-504
- LIPP M, BRODMANN P, PIETSCH K, PAUWELS J, ANKLAM E (1999) IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder. *J AOAC Int* 82: 923-928
- LIU G, SU W, XU Q, LONG M, ZHOU J, SONG S (2003) Liquid-phase hybridization based PCR-ELISA for detection of genetically modified organisms in food. *Food Control* in press
- LIVAK K J, MARMARO J und TODD J A (1995) Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nature Genet* 9: 341-342
- LONGSTAFF M, EDMONDS E S und NEWELL C A (1995) An improved method for the detection and quantification of recombinant protein in transgenic plants. *Plant Mol Biol Rep* 13: 363-368
- LOPEZ-GRANADOS F und LUTMAN P J W (1998) Effect of environmental conditions on the dormancy and germination of volunteer oilseed rape seed (*Brassica napus*). *Weed Sci* 46: 419-423
- LUTMAN P J W (1993) The occurrence and persistence of volunteers oilseed rape (*Brassica napus*). *Asp Appl Biol* 35: 28-36
- MALIGA P (1999) Transplastomic technology for safer and better transgenic crops. *Agrobiotech* 17: 28
- MANIATIS T, FRITSCH E F, SAMBROCK J (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- MARIANI C, BEUCKELEER M D, TRUETTNER J, LEEMANS J, GOLDBERG R B (1990) Induction of male sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene. *Nature* 347: 737-741
- MARIANI C, GOSSELE V, DE BEUCKELEER M, DE BLOCK M, GOLDBERG R B, DE GREEF W, LEEMANS J (1992) A chimeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* 357: 384-389
- MATSUOKA T, KURIBARA H, TAKUBO K, AKIYAMA H, MIURA H, GODA Y, KUSAKABE Y, ISSHIKI K, TOYODA M, HINO A (2002) Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*). *J Agr Food Chem* 50: 2100-2109
- MC CARTNEY A A und LACEY M E (1991) Wind dispersal of pollen from crops of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Aerosol Science* 4: 467-477
- MC KENZIE M J, METT V, JAMESON P E (2000) Modified ELISA for the detection of neomycin phosphotransferase II in transformed plant species. *Plant Cell Rep* 19: 286-289
- MESQUIDA J, RENARD M (1982) Study of the pollen dispersal by wind and of the importance of wind pollination in rapeseed (*Brassica napus* var *oleifera* Metzger). *Apidology* 4: 353-366
- MEYER R (1995) Nachweis gentechnologisch veränderter Pflanzen mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) am Beispiel der Flavr SavrTM-Tomate. *Z Lebensm Unters Forsch* 201: 583-586
- MEYER R (1999) Development and application of DNA analytical methods for the detection of GVOs in food. *Food Control* 10: 391-399
- MEYER R, CHARDONNENS F, HÜBNER P, LÜTHY J (1996) Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Lebensm Unters Forsch* 203: 339-344
- MEYER R, HÖFELEIN C, LÜTHY J, CANDRIAN U (1995) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J AOAC Int* 78: 1542-1551
- MITCHELL P (2003) Europe sees sharp decline in GVO research. *Nature Biotechnol* 21: 468-469
- MITCHELL P, BRADBURY J (1999) British medical association enters GM-crop fray. *Lancet* 353: 1769
- MITUSHIMA U (1980) Genom analysis in *Brassica* and allied genera. In: TSUNODA S, HINATA K, Comez C C (Eds) *Brassica* crops and wild allies. Scientific Societies Press, Tokyo: 89-106
- MOEHRLE M, KRECH A, WINTERHALTER T, ZELTZ P (2000) Proceedings. JRC European Commission. <http://www.jrc.cec.eu.int/>
- MONSANTO (2003) <http://www.monsanto.de/Service/broschueren/Kompodium.pdf>
- MÖRCHEN M, CUGUEN J, MICHAELIS G, HÄNNI C, SAUMITOU-LAPRADE P (1996) Abundance and length polymorphism of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L. *Theor Appl Genet* 92: 326-333
- MORRIS W F, KAREIVA P M, RAYMER P L (1994) Do barren zones and pollen traps reduce gene escape from transgenic crops? *Ecol Appl* 4: 157-165
- MORRISON T, WEIS J, WITTEW C T (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR[®] Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* 24: 954-962

- MÜLHARDT C (2000) Der Experimentator, Molekularbiologie. 2 Aufl., Spektrum Verlag. Berlin: 112-113
- NAZARENKO I A, BHATNAGAR S K, HOHMAN R J (1997) A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. Nucl Acids Res 25: 2516-2521
- NETHERWOOD T, MARTÍN-QRÚE S M, O'DONNELL A G, GOCKLING S, GRAHAM J, MATHERS J C, GILBERT H J (2004) Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. Nature Biotechnol 22: 204-209
- NORRIE C (2002) New Zealand GVO incident highlights lack of standardized tests. Nature Biotechnol 20: 861
- ODELL J T, NAGY F, CHUA N-H (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature 313: 810-812
- PAN T-M (2002) Current Status and detection of genetically modified organism. J Food Drug Anal 10: 229-241
- PASTINEN T, RAITIO M, LINDROOS K, TAINOLA P, PELTONEN L, SYVANEN AC (2000) A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. Genome Research 10: 1031-1042
- PARDIGOL A, GUILLET S, PÖPPING B (2003) A simple procedure for quantification of genetically modified organisms using hybrid amplicon standards. Eur Food Res Technol 216: 412-420
- PAULI U, LINIGER M, SCHROTT M, SCHOUWEY B, HÜBNER P, BRODMAN P, EUGSTER A (2001) Quantitative detection of genetically modified soybean and maize: Method evaluation in Swiss Rin Tirol. Mitt Gebiete Lebensm Hyg 92: 145-158
- PAULI U, LINIGER M, ZIMMERMANN A (1998) Detection of DNA in soybean oil. Z Lebensm Unters Forsch 207: 264-267
- PAWLOWSKI W P, SOMERS D A (1998) Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. Pro Natl Acad Sci USA 95: 12106-12110
- PECCOUND J, JACOB C (1996) Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction. Biophysical Journal 71: 101-108
- PEIRSON N S, BUTLER J N, FOSTER R G (2003) Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. Nucl Acids Res 31: e73 1-7
- PEKRUN C, LUTMAN P J W (1998) The influence of post-harvest cultivation on the persistence of volunteer oilseed rape. Asp Appl Biol 51: 113-118
- PEKRUN C, LUTMAN P J W, BAEUMER K (1998a) Research on volunteer rape: a Review. Pflanzenbauwissenschaften 2: 84-90
- PEKRUN C, HEWITT J D J, LUTMAN P J W (1998b) Cultural control of volunteer oilseed rape (*Brassica napus*). J Agr Sci 130: 155-163
- PERMINGEAT H R, REGGIARDO M I, VALLEJOS R H (2002) Detection and quantification of transgenes in grains by multiplex and real-time PCR. J Agr Food Chem 50: 4431-4436

- PETERSEN M, SANDER L, CHILD R D, VAN ONKELEN H, ULVSKOV P, BORKHARDT B (1996) Isolation and characterisation of pod dehiscence zone-specific polygalacturonase from *Brassica napus*. *Plant Mol Biol* 31: 517-527
- PETIT L, BARAIGE F, BALOIS A-M, BERTHEAU Y, FACH P (2003) Screening of genetically modified organisms and specific detection of Bt176 maize in flours and starches by PCR-enzyme linked immunosorbent assay. *Eur Food Res Technol* 217: 83-89
- PIATEK A S, TYAGI S, POL A C, TELENTI A, MILLER L P, KRAMER F R, ALLAND D (1998) Molecular beacon sequence analysis for detection drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Biotechnol* 16: 359-363
- PIETSCH K, WAIBLINGER H-U, BRODMANN P, WURZ A (1997) Screeningverfahren zur Identifizierung "gentechnisch veränderter" pflanzlicher Lebensmittel. *Deut Lebensm Rundsch* 93: 35-38
- PÖPPING B (2001) Methods for the detection of genetically modified organisms: Precision, pitfalls and proficiency. <http://www.iscpubs.com/articles/al/a0102pop.pdf>
- POWELL J, OWEN L (2002) Reliability of food measurements: the application of proficiency testing to GVO analysis. *Accredit Qual Assur* 7: 392-402
- PRICE J S, R N HOBSON, NEALE M A, BRUCE D M (1996) Seed losses in commercial harvesting of oilseed rape. *J Agric Engng Res* 65: 183-191
- PROKISCH J, ZELENY R, TRAPMANN S, GUERN L LE, SCHIMMEL H, KRAMER G N, PAUWELS J (2001) Estimation of the minimum uncertainty of DNA concentration in a genetically modified maize sample candidate certified reference material. *Fresen J Anal Chem* 370: 935-939
- QUINTEIRO J, SOTELO C G, REHBEIN H, PRYDE S E, MEDINA I, PÉREZ-MARTÍN R I, REY-MÉNDEZ M, MACKIE I M (1998) Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *J Agr Food Chem* 46: 1662-1669
- RAMÓN D, MAC GABE A, GIL J V (2004) Questions linger over European GM food regulations. *Nature Biotechnol* 22: 149
- RAYBOULD A F, GRAY A J (1994) Will hybrids of genetically modified crops invade natural communities? *Trends Ecol Evol* 9: 85-89
- RAYBOULD A F, MASKELL L C, EDWARDS M-L, COOPER J I, GRAY A J (1999) The prevalence and spatial distribution of viruses in natural populations of *Brassica oleracea*. *New Phytol* 141: 265-275
- RIDLEY S M, MC NALLY S F (1985) Effects of phosphinothricin on the isoenzymes of glutamine synthetase isolated from plant species which exhibit varying degrees of susceptibility to the herbicide. *Plant Sci* 39: 31-36
- RIEDY M C, STEWART E A J (1995) Quantitative RT-PCR for measuring gene expression. *BioTechniques* 18: 70-76
- RIEGER M A, LAMOND M, PRESTON C, POWLES S B und ROUSH R T (2002) Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial canola fields. *Science* 296: 2386-2388
- RIEGER M A, PRESTON C, POWLES S B (1999) Risks of gene flow from transgenic herbicide-resistant canola (*Brassica napus*) to weedy relatives in southern Australian cropping systems. *Aust J Agric Res* 50: 115-128

- RIRIE K M, RASMUSSEN R P, WITTEW C T (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245: 154-160
- ROBINSON J K, MUELLER R, PHILIPPONE L (2000) The new molecular beacon technology. *Strategies Newspaper*. <http://www.iscpubs.com/articles/al/a0012.rob.pdf>
- ROGAN G J, DUDIN Q A, LEE T C, MAGIN K M, ASTWOOD J D, BHAKTA N S, LEACH J N, SANDERS P R, FUCHS R L (1999) Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready soybean. *Food Control* 10: 407-414
- ROGAN G J, REAM J E, BERBERICH S A und FUCHS R L (1992) Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of neomycin phosphotransferase II in genetically modified cotton tissue extracts. *J Agr Food Chem* 40: 1453-1458
- ROLLER A, BEISMANN H, ALBRECHT H (2002) Persistence of genetically modified, herbicide-tolerant oilseed rape - first observations under practically relevant conditions in South Germany. *Z Pfl Krankh Pfl Schutz Sonderheft XVIII*: 255-260
- ROLLER A, BEISMANN H, ALBRECHT H (2003) The influence of soil cultivation on the seedbank of GM-herbicide tolerant and conventional oilseed rape. *Asp Appl Biol* 69: 131-135
- ROMPPANEN E-L, SAVOLAINEN K, MONONEN K (2000) Optimal use of the fluorescent PicoGreen dye for quantitative analysis of amplified polymerase chain reaction products on microtiterplate. *Anal Biochem* 279: 111-114
- RØNNING S B, VAITILINGOM M, BERDAL K G, HOLST-JENSEN A (2003) Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified B11 maize (*Zea mays*). *Eur Food Res Technol* 216: 347-354
- RUF S, HERMANN M, BERGER I J, CARRER H, BOCK R (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids - high-level foreign protein expression in fruits. *Nature Biotechnol* 19: 870-875
- RUHLAND M, ENGELHARDT G, PFWLIZKI K (2002) A comparative investigation of the metabolism of the herbicide glufosinate in cell cultures of transgenic glufosinate-resistant and non-transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) and corn (*Zea mays*). *Environ Biosafety Res* 1: 29-37
- RUTH L (2003) Tailoring thresholds for GVO testing. *Anal Chem* 1: 393A - 396A
- SACHS L (1999). *Angewandte Statistik, Anwendung statistischer Methoden*. 9 Aufl. Springer Verlag, Berlin: 2110-226
- SAIKI R K, GELFAND D H, STOFFWEL S, SCHARF S J, HIGUCHI R, HORN G T, MULLIS K B, ERLICH H A (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- SANDBERG M, LUNDBERG L, FERM M, YMAN I MALMHEDEN (2003) Real-Time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. *Eur Food Res Technol* 217: 344-349
- SANGER F, NICKLEN S, CUULSON A R (1970) DNA sequencing with the chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- SAURE C, KÜHNE S, HOMMEL B (1999) Untersuchungen zum Pollentransfer von transgenem Raps auf verwandte Kreuzblütler durch Wind und Insekten. In: SCHIEMANN J (Ed) *Biologische*

- Sicherheitsforschung bei Freilandversuchen mit transgenen Organismen und anbaubegleitendes Monitoring. Maul Druck, Braunschweig: 21-30
- SAWYER J, WOOD C, SHANAHAN D, GOUT S, MC DONALL D (2002) Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control* 14: 579-583
- SCHEFFLER A J, PARKINSON R, DALE P J (1993) Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). *Transgenic Res* 2: 356-364
- SCHEFFLER A J, PARKINSON R, DALE P J (1995) Evaluating the effectiveness of isolation distances for field plots of oilseed rape (*Brassica napus*) using a herbicide-resistance transgene as a selectable marker. *Plant Breed* 114: 317-321
- SCHIEMANN J (2000) Mitteilungen aus der BBA-Arbeitsgruppe 'Anbaubegleitendes Monitoring gentechnisch veränderter Pflanzen im Agrarökosystem'. *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst* 52: 230-236
- SCHLINK S (1989) Keimruhe bei Körnerraps (*Brassica napus* L.) in Abhängigkeit von Sorte, Jahr und Tiefenlage im Boden. *Mitt Ges Pflanzenbauwiss* 2: 129-132
- SCHLINK S (1994) Ökologie der Keimung und Dormanz von Körnerraps (*Brassica napus* L.) und ihre Bedeutung für eine Überdauerung der Samen im Boden. *Diss. Botanicae. J. Cramer Verlag, Berlin*: 28-125
- SCHLINK S (1998) 10 years survival of rape seed (*Brassica napus* L.) in soil. *Z Pfl Kranh Pfl Schutz Sonderheft XVI*: 169-172
- SCHMIDT M A, PARROTT W A (2001) Quantitative detection of transgenes in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] and peanut (*Arachis hypogaea* L.) by real-time polymerase chain reaction. *Plant Cell Rep* 19: 781-786
- SCHWARZ G (2002) Persönliche Mitteilung
- SCHWARZ G (2003) Bestimmung der Persistenz transgenen Rapses in der landwirtschaftlichen Umwelt. <http://www.biosicherheit.de/projekte/144.proj.html>
- SCOTT S E, WILKINSON M J (1998) Transgene risk is low. *Nature* 393: 320
- SCOTT S E, WILKINSON M J (1999) Risks of transgen escape from transplastomic oilseed rape. Brighton Crop Protection Conference - Weeds 17: 390-392
- SHINDO Y, KURIBARA H, MATSUOKA T, FUTO S, SAWADA C, SHONO J, TAKUBO K, AKIYAMA H, GODA Y, TOYODA M, HINO A (2002) Validation of real-time PCR analyses for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules. *J AOAC Int* 85: 1119-1126
- SHIRAI N, MOMMA K, OZAWA S, HASHIMOTO W, KITO M, UTSUMI S, MURATA K (1998) Safety assessment of genetically engineered food: detection and monitoring of glyphosate-tolerant soybeans. *Biosci Biotech Bioch* 62: 1461-1464
- SHUMAKER JM, METSPALU A, CASKEY CT (1996) Mutation detection by solid phase primer extension. *Hum Mutation* 7: 346-354
- SHUMAN S (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269: 32678-32684

- SMITH A E (1988) Persistence and transformation of the herbicide [14C] glufosinate-ammonium in prairie soils under laboratory conditions. *J Agr Food Chem* 36: 393-397
- SOONG R, LADÁNYI A (2003) Improved indicators for assessing the reliability of detection and quantification by kinetic of PCR. *Clin Chem* 49: 973-976
- SPERTINI D, BÉLIVEAU C, BELLEMARE G (1999) Screening of transgenic plants by amplification of unknown genomic DNA flanking T-DNA. *BioTechniques* 27: 308-312
- SPIESS E (1986) Ernteverluste bei Raps. *Raps* 4: 108-112
- SPRICK P, SCHUMACHER K-D, SINEMUS K (2003) Hintergrundpapier des Gesprächskreis Grüne Gentechnik (GGG) zum Thema 'Gentechnik-frei'.
<http://www.asa-hamburg.de/site9.html>
- STAVE J W (1999) Detection of new or modified proteins in novel foods derived form GVO - future needs. *Food Control* 10: 367-374
- STAVE J W (2002) Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: application, limitation and practical considerations. *J AOAC Int* 85: 780-786
- STRAUB J A, HERTEL C, HAMMES W P (1999) Limits of a PCR-based detection method for genetically modified soya in wheat bread production. *Z Lebensm Unters Forsch* 208: 77-82
- STUDER E, DAHINDEN I, LÜTHY J, HÜBNER P (1997) Nachweis des gentechnisch veränderten "Maximizer" Mais mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). *Mitt Gebiete Lebensm Hyg* 88: 515-524
- STUDER E, RHYNER C, LÜTHY J, HÜBNER P (1998) Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize. *Z Lebensm Unters Forsch* 207: 207-213
- SUNILKUMAR G, CONNELL J P, SMITH C W, REDDY A S, RATHORE K S (2002) Cotton α -globulin promoter: isolation and functional characterization in transgenic cotton, *Arabidopsis*, and tobacco. *Transgenic Res* 11: 347-359
- TABERLET P, GIELLY L, PAUTOU G, BOUVET J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol* 17: 1105-1109
- TAVERNIERS I, WINDELS P, VAN BOCKSTAELE E, DE LOOSE M (2001) Use of cloned DNA fragments for event-specific quantification of genetically modified organisms in pure and mixed food products. *Eur Food Res Technol* 213: 417-424
- TEPFER D, GARCIA-GONZALES R, MANSOURI H, MSERUGA, MESSAGE B, LEACH F, PERICA M CURKOVIC (2003) Homology-dependent DNA transfer from plants to a soil bacterium under laboratory conditions: implications in evolution and horizontal gene transfer. *Transgenic Res* 12: 425-437
- TERRY C F, HARRIS N (2001) Event-specific detection of Roundup Ready Soya using two different Real-Time PCR detection chemistries. *Eur Food Res Technol* 213: 425-431
- TERRY C F, SHANAHAN D J, BALLAM L D, HARRIS L, MC DOWELL D G, PARKES H C (2002) Real-Time detection of genetically modified soya using lightcycler and ABI 7700 platforms with Taqman, Scorpion, and SYBR Green I chemistries. *J AOAC Int* 85: 938-944

- TERZI V, FERRARI B, FINOCCHIARO F, DI FONZO N, STANCA A M, LAMACCHIA C, NAPIER J, SHEWRY P R, FACCIOLI P (2003) TaqMan PCR for detection of genetically modified durum wheat. *J Cereal Sci* 37: 157-163
- THELWELL N, MILLINGTON S, SOLINAS A, BOOTH J, BROWN T (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucl Acids Res* 28: 3752-3761
- TICHOPAD A, DILGER M, SCHWARZ G, PFAFFL M W (2003) Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucl Acids Res* 31: 1-6
- TIMMONS A M, O'BRIEN E T, CHARERS Y M, DUBBELS S J, WIKINSON M J (1995) Assessing the risk of wind pollination from fields of genetically modified *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *Euphytica* 85: 417-423
- TOWNSEND B J, LLEWELLYN D J (2002) Spatial and temporal regulation of a soybean (*Glycine max*) lectin promoter in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum*). *Funct Plant Biol* 29: 835-843
- TRANSGEN (2002) Koexistenz und Wahlfreiheit - ein Spiel mit verdeckten Karten.
<http://www.transgen.de/Aktuell/wahlfreiheit.html>
- TRANSGEN (2004a) GVO-Zulassungen nach EU-Recht - Stand der Dinge.
http://www.europa.eu.int/rapid/start/cpi/guesten.ksh?p_action.gentfile=gf&doc=MEMO/04/17/0RAPID&lg=DE&type=PDF
- TRANSGEN (2004) Fragen und Antworten zur GVO-Regelung in der EU.
<http://www.transgen.de/pdf/rechtsvorschriften/EU-KomFA150404.pdf>
- TRAPMANN S, GUERN L LE, PROKISCH J, ROBOUCH P, KRAMER G N, SCHIMMEL H, PAUWELS J (2001) The certification of reference materials of dry mixed maize powder with different mass fractions of MON 810 maize. JRC European Commission. <http://www.irmm.jrc.be/rm/> EUR 20111
- TYAGI S, MARRAS S A E, KRAMER F R (2000) Wavelength-shifting molecular beacons. *Nature Biotechnol* 18: 1191-1196
- U N (1934) Genome-analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *J JPN Botany* 3: 389-452
- UMWELTBUNDESAMT (2000) Eckpunkte für ein Monitoring der Umweltwirkungen von gentechnisch veränderten Pflanzen (GVP).
<http://www.umweltbundesamt.de/UBA-info-daten/daten/bsg/bsg5.html>
- VAECK M, REYNAERTS A, HÖFTE H, JANSSENS S, DE BEUCKELEER M, DEAN C, ZABEAU M, VAN MONTAGU M, LEEMANS J (1987) Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328: 33-37
- VAN DUIJN G, VAN BIERT R, BLEEKER-MARCELIS H, VAN BOEIJEN I, ADAN A JAMA, JHAKRIE S, PEPELMAN H, HESSING M (2002) Detection of genetically modified organisms in foods by protein- and DNA-based techniques: Bridging the methods. *J AOAC Int* 85: 787-791
- VAN DUIJN G, VAN BIERT R, BLEEKER-MARCELIS H, PEPELMAN H, HESSING M (1999) Detection methods for genetically modified crops. *Food Control* 10: 375-378
- VAN DUIJN G, HESSING M, VAN DER KAMP J W (1997) Identification of transgenic plants in foods. *C R Acad Agric Fr* 83: 153-157

- VAN HOEF A M A, KOK E J, BOUW E, KUIPER H A, KEIJER J (1998) Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy-derived products. *Food Addit Contam* 15: 767-774
- VÄTILINGOM M, PIJNENBURG H, GENDRE F, BRIGNON P (1999) Real-Time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods. *J Agr Food Chem* 47: 5261-5266
- VANDEKERCKHOVE J, DAMME J, VAN LIJSEBETTENS M (1989) Enkephalins produced in transgenic plants using modified 2S seed storage proteins. *Biotechnol* 7: 929-932
- VERA C L, MC GREGOR D I, DOWNEY R K (1987) Detrimental effects of volunteer *Brassica* on production of certain cereal and oilseed crops. *Can Journal Plant Sci* 67: 983-985
- VICKERS J E, GRAHAM G C, HENRY R J (1996) A protocol for the efficient screening of putatively transformed plants for *bar*, the selectable marker gene, using the polymerase chain reaction. *Plant Mol Biol Rep* 14: 363-368
- VOLLENHOFER S, BURG K, SCHMIDT J, KROATH H (1999) Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction. *J Agr Food Chem* 47: 5038-5043
- WADMAN M (1999) US processors reject maize that EU won't take. *Nature* 398: 736
- WAIBLINGER H-U, GUTMANN M, HÄDRICH J, PIETSCH K (2001) Validierung der Real-time PCR zur Quantifizierung von gentechnisch veränderter Soja. *Deut Lebensm Rundsch* 4: 121-125
- WAIBLINGER H-U, WURZ A, FREYER R, PIETSCH K (1999) Spezifischer Nachweis von gentechnisch verändertem Raps in Honig. *Deut Lebensm Rundsch* 5: 44-48
- WESTERMEIER P M (2003) Bestimmung der Transgenanteile von Ausfallraps mit Hilfe der quantitativen PCR-Analytik. Diplomarbeit. TU München: 29-41
- WHITCOMBE D, THEAKER J, GUY S P, BROWN T, LITTLE S (1999) Detection of PCR products using selfprobing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnol* 17: 804-807
- WHITEHEAD R, WRIGHT H C (1989) The incidence of weeds in winter cereals in Great Britain. *Proceedings British Crops Protection Conference - Weeds*: 107-112
- WIDMER F, SEIDLER R J, DONEGAN K K, REED G L (1997) Quantification of transgenic plant marker gene persistence in the field. *Mol Ecol*: 1-7
- WILKINSON M J, TIMMONS A M, CHARTERS Y, DUBBELS S, ROBERTSON A, WILSON N, SCOTT S, O'BRIEN E, LAWSON H M (1995) Problems of risk assessment with genetically modified oilseed rape. *Brighton Crop Protection Conference - Weeds*: 1035-1044
- WINDELS P, BERTRAND S, DEPICKER A, MOENS W, BOCKSTAELE E, DE LOOSE M (2003) Quantitative and event-specific PCR real-time detection methods for StarLink maize. *Eur Food Res Technol* 216: 259-263
- WINDELS P, TAVERNIER I, DEPICKER A, VAN BOCKSTAELE E, DE LOOSE M (2001) Characterisation of the Roundup Ready soybean insert. *Eur Food Res Technol* 213: 107-112
- WINTERMANTEL W M, SCHOELZ J E (1996) Isolation of recombinant viruses between Cauliflower Mosaik Virus and viral gene in transgenic plants under conditions of moderate selections pressure. *Virology* 223: 156-164

- WISEMAN G (2002) State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction. *J AOAC Int* 85: 792-796
- WITT R (1992) Zur Bionomie der Sandbiene *Andrena barbilabris* (Kirby 1802) und ihrer Kuckucksbienen *Nomada alboguttata* Gerrich-Schäffer 1839 und *Sphecodes pellucidus* Smith 1845. *Drosera* 92: 47-81
- WITWER C T, HERMANN M G, MOSS A A, RASMUSSEN R P (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 22: 130-138
- WOHLLEBEN W, ARNOLD W, BROER I, HILLEMANN D, STRAUCH E, PÜHLER A (1988) Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70: 25-37
- WOLF C, HÜBNER P, LÜTHY J (2001) Detection of potato DNA from potato tubers and processed food products by means of PCR. *Mitt Gebiete Lebensm Hyg* 92: 159-167
- WOLF C, SCHERZINGER M, WURZ A, PAULI U, HÜBNER P, LÜTHY J (2000) Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. *Eur Food Res Technol* 210: 367-372
- WOOD D C, VU L V, KIMACK N M, ROGAN G J, REAM J E, NICKSON T E (1995) Purification and characterization of neomycin phosphotransferase II from genetically modified cottonseed (*Gossypium hirsutum*). *J Agr Food Chem* 43: 1105-1109
- WURZ A, BLUTH A, ZELTZ P, PFEIFER C, WILLMUND R (1999) Quantitative analysis of genetically modified organisms (GVO) in processed food by PCR-based methods. *Food Control* 10: 385-389
- WURZ A, WILLMUND R (1997) Identification of transgenic glyphosate-resistant soybeans. *Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin* 1/1997: 115-117
- YODER J I, GOLDSBROUGH A P (1994) Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. *Bio/Techn* 12: 263-267
- ZEITLER R, PIETSCH K, WAIBLINGER H-U (2002) Validation of real-time PCR methods for the quantification of transgenic contaminations in rape seed. *Z Lebensm Unters Forsch* 214: 346-351
- ZENZ K I, NEVE H, GEIS A, HELLER K J (1998) *Bacillus subtilis* develops competence for uptake of plasmid DNA when growing in mild products. *Syst Appl Microbiol* 21: 28-32
- ZIMMERMANN A, HEMMER W, LINIGER M, LÜTHY J, PAULI U (1998a) A sensitive detection method for genetically modified MaisGard corn using a nested PCR System. *Lebensm Wiss u Technol*: 664-667
- ZIMMERMANN A, LÜTHY J, PAULI U (1998b) Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Z Lebensm Unters Forsch* 207: 81-90
- ZIMMERMANN A, LÜTHY J, PAULI U (2000) Event specific transgene detection in Bt11 Corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensm Wiss u Technol* 33: 210-216

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Annette Block
Geburtsdatum	26.06.1967
Geburtsort	Hagen, NRW
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

September 1974 bis Juli 1978	Grundschule Hagen
September 1978 bis Mai 1984	Hauptschule Beolerheide, Hagen Hauptschulabschluss

Berufsausbildung

August 1984 bis September 1987	Berufsausbildung zur Gärtnerin Gesellenbrief
--------------------------------	---

Berufstätigkeit

Oktober 1987 bis August 1988	Gärtnerin
------------------------------	-----------

Zweiter Bildungsweg

September 1988 bis Juli 1992	Bayernkolleg Augsburg, Staatliches Institut zur Erlangung der allgemeinen Hochschulreife Allgemeine Hochschulreife
------------------------------	--

Berufstätigkeit

September 1992 bis Oktober 1994	Gärtnerin und Nebentätigkeiten
---------------------------------	--------------------------------

Akademische Ausbildung

November 1994 bis Dezember 1999	Studium der Gartenbauwissenschaften an der Technischen Universität München Abschluß als Diplom-Agraringenieurin (univ.)
---------------------------------	---

ab Juni 2000	Wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Techni- schen Universität München
--------------	---