

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik	
<b>Probennahme von Pflanzenmaterial</b>	<b>AM010</b>
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, März 2002	
Status: verabschiedet	

### **1. Zweck und Anwendungsbereich**

Diese Vorschrift gilt für das einheitliche Vorgehen bei der Entnahme, dem Transport und der Konservierung von Pflanzenmaterial im Rahmen der experimentellen Überwachung nach dem GenTG. Durch die Probennahme von Pflanzenmaterial soll für nachfolgende molekulargenetische Untersuchungen eine Stichprobe repräsentativer Zusammensetzung erhalten werden, wobei die Technik der Probennahme von der Fragestellung abhängt.

Im Folgenden werden verschiedene Fragestellungen und ihre Auswirkung auf die Probennahme näher beschrieben und in Arbeitsanweisungen (SOP 1-3) zusammengestellt.

**SOP 1:** Probenahme zum Nachweis transgener Sequenzen in einzelnen Pflanzen oder kleinen Pflanzenpopulationen:

Diese können

- a) aus Ausfall-Saatgut stammen und bei Nachkontrollen von Flächen im Anschluss eines Freisetzungsvorhabens genommen werden oder
- b) es können gentechnisch veränderte Pflanzen sein, die außerhalb von Freisetzungsfeldern vorkommen (z.B. in benachbarten Ackerrandstreifen oder an Strassenrändern) oder
- c) es können Hybriden mit kreuzbaren Arten sein.

**SOP 2:** Probenahme zur Bestätigung der eingeführten transgenen Sequenzen, um angegebene Konstrukte zu überprüfen: Dazu wird eine geringe Anzahl von Proben benötigt. Es kann Saatgut, vegetatives Pflanzenmaterial oder Erntegut aus Freisetzungsvorhaben oder von In-Verkehr-gebrachten GVO überprüft werden.

**SOP 3:** Probenahme zur Prüfung auf Verunreinigungen durch GVO: Diese Fragestellung bedingt eine größere Zahl von Einzelproben, die nötig ist, um den Anteil der Kontamination von GVO in Feldern mit anderen transgenen Pflanzen oder mit konventionellen Linien oder Sorten zu erfassen. Die Herkunft der Proben kann sein:

SOP 3a) Saatgut zugelassener Sorten

SOP 3b) Felder, deren Saatgut verunreinigt war

SOP 3c) Felder, die benachbart zu einer Freisetzungsfeldfläche oder Anbaufläche mit transgenen Pflanzen liegen

### **2. Kurzbeschreibung**

Das hier vorgestellte Konzept basiert auf folgenden Arbeitsschritten:

- Probennahme
- Probentransport und -versand
- Probenlagerung und -konservierung

### **3. Sicherheit**

Alle spezifischen Gesundheits- und Sicherheitsaspekte, die bei dem Umgang mit dem Pflanzenmaterial zu beachten sind (z.B. Pestizidrückstände oder Beizmittel bei Saatgut), müssen festgestellt und ggf. geeignete Schutzmaßnahmen ergriffen werden. Welche Mittel benutzt wurden und welche Schutzmaßnahmen nötig sind, ist von außen sichtbar auf dem Probebehälter zu vermerken.

#### **4. Materialliste**

- Kugelschreiber
- Wasserfester Filzstift (z.B. Edding)
- Leere oder vorgedruckte Etiketten, Aufkleber
- Ggf. Kühlbox (Styroporbox oder Kunststoffkühltasche mit Kühlelementen)

Probenbehälter: sollten neu sein und nicht mehrfach benutzt werden. Geeignet sind beispielsweise PVC-Beutel (verschießbar), stabile Papiertüten, Kunststoffröhrchen mit Schraubdeckel oder Kunststoffboxen mit Deckel

#### **5. Durchführung**

##### **5.1 Allgemeines**

Zeitpunkt, Umfang und detaillierte Vorgehensweise einer jeden Probenahme sind dem Untersuchungsziel entsprechend in enger Koordination zwischen dem Probenehmer und dem Untersuchungslabor zu planen.

##### **5.2 Probenmaterial**

Als Probenmaterial für den molekularbiologischen Nachweis von Transgenen eignet sich sowohl Saatgut (ungebeizt oder gebeizt) als auch vegetatives Pflanzenmaterial, z.B. Blätter. Saatgut hat jedoch den Vorteil der besseren Lagerfähigkeit, insbesondere auch im Hinblick auf den Transport.

Für spezielle Fragestellungen, z.B. den Nachweis von transgenen Agrobakterien in Primärtransformanten (s. SOP des UA „Methodenentwicklung“: „Nachweis von persistierenden Agrobakterien in transgenen Kulturpflanzen und deren mikro- und molekularbiologische Charakterisierung“) ist nach Abstimmung mit dem Untersuchungslabor auch Wurzel- bzw. Stängelmaterial zu beproben.

##### **5.3 Probenahme bei SOP 1 bis 3**

###### **5.3.1 SOP 1 (Einzelpflanzen und kleine Pflanzenpopulationen)**

Zur Untersuchung von Einzelpflanzen oder Pflanzenpopulationen eignet sich vegetatives Material, welches im Verlauf der Vegetationsperiode oder als Erntegut beprobt werden kann. Bei Pflanzen in der Wachstumsphase werden ein oder zwei möglichst junge Blätter vom oberen Teil der Pflanze abgenommen und in eine Tüte oder in einen Probebeutel gelegt. Je nach Fragestellung kann eine Sammelprobe von mehreren Blättern sinnvoll sein (bei der Beprobung von Pflanzenpopulationen sollte z.B. von bis zu 100 Pflanzen je ein Blatt entnommen und in einer Tüte gelagert werden). Dies ist vorher mit dem Untersuchungslabor abzusprechen.

Die einzelnen Probenbeutel werden in einem Kasten oder einer größeren Tüte gesammelt. Je nach Aufgabenstellung ist eine Entnahme von Samen einzelner Pflanzen oder von mehreren Pflanzen als Sammelprobe angezeigt. Dabei ist darauf zu achten, dass verschiedene Pflanzenarten immer getrennt gesammelt werden (SOP 1c). Der Standort der Probenpflanzen sollte auf einem Versuchsplan markiert und die Proben so bezeichnet werden, dass ihr Standort, wenn nötig, später zugeordnet werden kann. Eine fotografische Dokumentation der Standorte ist ggf. sinnvoll.

### 5.3.2 SOP 2 (Bestätigung)

Um z.B. bei einem Freisetzungsvorhaben die gentechnische Veränderung zu überprüfen, kann entweder vor der Aussaat Saatgut oder zu einem späteren Zeitpunkt der Freisetzung vegetatives Pflanzenmaterial beprobt werden.

Im Falle von Vegetationsproben sollten von drei bis zehn Pflanzen pro Anbaufläche mit einheitlichen GVP (gentechnisch veränderte Pflanzen) je ein junges Blatt als Probe genommen werden. Die Anzahl der zu entnehmenden Proben ist so zu wählen, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit GVP von der Anbaufläche entnommen werden. Da davon ausgegangen werden kann, dass die Pflanzen überwiegend transgen sind, braucht diese Zahl auch bei großen Flächen nicht erhöht zu werden. Die Blattproben sollen über die gesamte Freisetzungsfäche verteilt genommen werden. Bei mehrparzelligen Versuchen sollten ggf. verschiedene Parzellen unabhängig voneinander beprobt werden.

Bei Saatgut liegt der Mengenbedarf bei mind. 50 Samen; die Samenprobe wird entweder als Stichprobe aus dem Saatgutsack entnommen oder falls das Saatgut für Parzellenversuche in kleine Aliquots/ Tütchen aufgeteilt wurde, in Absprache mit dem Betreiber als zusätzlich abgefülltes Aliquot genommen. Da das Saatgut bei Freilandversuchen mit transgenen Pflanzen häufig limitiert ist, sollten vorgesehene Saatgutbeprobungen vorab mit dem Betreiber abgestimmt werden.

Die Proben sollen möglichst auf dem Feld oder aber direkt bei der Saatgutabfüllung in Anwesenheit der zuständigen Überwachungsbehörde entnommen werden.

### 5.3.3 SOP 3: (Verunreinigungen)

**Hinweis:** Die Erstellung der SOP zur Probenahme von Pflanzenmaterial zur Prüfung auf Verunreinigungen wird zur Zeit erarbeitet und zu einem späteren Zeitpunkt hier eingefügt.

### 5.4 Technik der Probenahme

1. Die vorher in Abstimmung mit dem Untersuchungslabor festgelegte Pflanzenzahl sollte gleichmäßig über das ganze Feld verteilt beprobt werden.
2. Das Probenmaterial sollte nicht zu feucht sein (Schimmelbildung!). Feuchte Proben sind bevorzugt in Papiertüten oder zunächst in saugfähiges Papier anstelle von Kunststoffbeuteln zu verpacken und gekühlt in geschlossenen Behältnissen zu transportieren.
3. Bei Pflanzen in der Wachstumsphase wird ein junges Blatt vom oberen Teil der Pflanze abgenommen und in eine neue Papier- oder Plastiktüte gelegt, die leicht aufgeblasen und dann verschlossen wird.
4. Blätter, die mit Erde, Pollen oder abgestorbenen Pflanzenteilen verunreinigt sind, sind nicht geeignet.
5. Sollen Blätter von seneszenten Pflanzen beprobt werden, sind die "frischesten" Blätter zu nehmen.
6. Bei Zuckerrübenwurzeln werden mindestens 100 g Material benötigt. Sie werden zuerst in trockenes saugfähiges Papier, dann in eine Plastiktüte gepackt, die verschlossen wird.
7. Probenmaterial von verschiedenen Chargen, gentechnisch veränderten Linien oder Hybriden muss - soweit möglich - separat beprobt werden.
8. Der Probenbeutel wird, wie unten beschrieben, gekennzeichnet.

## 5.5 Probenkennzeichnung

Jede Probe muss mindestens mit einer unverwechselbaren Probenbezeichnung (z.B. alphanumerischer Code) und dem Datum der Probenahme versehen werden, damit eine eindeutige Zuordnung zum Probennahmeprotokoll möglich ist. Die Kennzeichnung sollte in Form von Etiketten oder einer gut lesbaren Beschriftung eindeutig und dauerhaft angebracht sein.

Wenn viele Einzelproben genommen werden, sollten diese nicht nur mit dem Feldnamen sondern systematisch nummeriert werden (z.B. Probe 1: Feldmitte, Probe 2: Nordseite usw.) und in einer schematischen Feldskizze eingetragen werden. Dies erleichtert die Protokollführung im Labor und hilft, Fehler zu vermeiden.

Mit einem wasserfesten Stift oder vorgefertigten Etiketten sollten zusätzlich folgende Angaben auf den Proben oder dem dazugehörigen Probennahmeprotokoll vermerkt werden:

- Probennummer, einschließlich Versuchsnummer, wenn möglich, aus den vorliegenden Unterlagen übernehmen
- Fundort/Standort (im allgemeinen das Feld oder die Stelle, an der die Proben genommen wurden, Kartenreferenz)
- Datum
- Pflanze (Raps, Zuckerrübe, Mais...)
- Projektnummer oder Aktenzeichen des Freisetzungsbescheides
- Name des Probenehmers und
- chemische Behandlung, die an dem Probegut durchgeführt wurde

## 5.6 Probennahmeprotokoll

Das Probennahmeprotokoll dient dem Probenehmer als Merkliste und ggf. Beprobungsplan, den beteiligten Behörden und Betreibern zur Dokumentation der Probenübergabe und der Untersuchungsstelle als Begleitdokument zur Probenidentifizierung.

Ein Probennahmeprotokoll soll im Falle von Freisetzungsversuchen mindestens folgende Angaben enthalten:

Datum und Anlass (Aussaat, Ernte etc.) der Probenahme, Betreiber der Freisetzung, Freisetzungsstandort, transgene Pflanze, gentechnische Veränderung, Aktenzeichen der Genehmigungsbehörde, Saatgutherkunft, Abfüllungsort, Menge und Bezeichnung des Saatgutes (Code-Nr. des Betreibers und/ oder Parzellennummer, Sorten- bzw. Linienbezeichnung, Konstruktname, Probennummer des Labors), Art der Proben (Samen (gebeizt, ungebeizt), Blätter, Wurzeln etc.), Unterschriften des Verantwortlichen für Probenabfüllung, der Überwachungsbehörde und des Untersuchungslabors.

Weiterhin sind Besonderheiten (z.B. Probenahme direkt nach Herbizidspritzung) und Auffälligkeiten (z.B. Krankheitsbefall) zu dokumentieren, da dies zu einer Gefährdung des Untersuchungspersonals führen oder Einfluß auf die molekularen Analysen haben könnte.

Ebenfalls sollten Angaben über Lagerungs- und Transportbedingungen bis zur Übergabe der Proben an das Labor gemacht werden.

Ein Beispiel eines Formulars für ein Probennahmeprotokoll (SOP 2) ist im Anhang A beigefügt.

## 5.7 Transport und Verschicken der Proben

Der Transport von pflanzlichen Samenproben, die entsprechend Punkt 5.4 in Probenahmetüten verpackt wurden, hat in geschlossenen, bruchsicheren Behältern zu erfolgen (z.B. Kunststoffboxen). Da bei vegetativem Pflanzenmaterial keine Gefahr im Hinblick auf eine Verbreitung von GVO durch Havarie des Behältnisses besteht, ist hier eine doppelte Transportverpackung in stabilen und verschlossenen (verklebt oder verschweißt) Kunststoffbeuteln ausreichend.

Saatgutproben können ungekühlt transportiert werden. Vegetative Pflanzenproben sollten in Abhängigkeit von der Transportdauer und bei hohen Umgebungstemperaturen ggf. in Kühlboxen transportiert werden. Eine Kühltasche oder eine Box mit Kühlakkus oder Eis sind gut geeignet.

Zum Versand werden die Beutel in der gleichen Reihenfolge wie auf dem Probenprotokoll dokumentiert in stabile Pappschachteln oder Kunststoffboxen verpackt.

Das Paket wird außen beschriftet mit:

- Name und Adresse des Empfängers (Person/Labor)
- Inhalt (Biologisches Untersuchungsmaterial; S1)
- Versanddatum
- Name und Adresse des Absenders

Es ist sicherzustellen, dass die Proben dem Untersuchungslabor unverzüglich zugestellt werden. Dies ist insbesondere bei feuchtem Probenmaterial (Schimmelbildung) und bei hohen Umgebungstemperaturen angezeigt.

Der Empfänger ist im Voraus über die Absendung und das voraussichtliche Eintreffen der Proben zu informieren, vor allem wenn sie außerhalb der Arbeitszeit oder am Wochenende eintreffen können.

Mögliche Transportwege sind:

- Direkt durch den Probennehmer oder Kollegen
- Post, UPS, DPD oder anderer Paketdienst: Brief- oder Paketpost, eventuell per Einschreiben
- Eilzustellung, wenn sichergestellt ist, dass die Proben auch zu unüblichen Zustellungszeiten in Empfang genommen werden können
- Kurierdienste kommen, da teuer, meist nur in Ausnahmefällen zum Einsatz, wenn die Proben noch am gleichen Tag das Labor erreichen müssen

## **5.8 Lagerung und Konservierung der Proben**

Nach Eintreffen im Laboratorium sollten die Proben umgehend untersucht oder in geeigneter Form gelagert werden. Gegebenenfalls müssen die Proben vor der Dauerlagerung getrocknet werden (z.B. Saatgut 2 Tage im Trockenschrank bei 30°C).

Die Dauerlagerung von Saatgut kann bei Raumtemperatur im Dunkeln erfolgen, sofern die Keimfähigkeit für spätere Untersuchungen vernachlässigbar ist. Soll die Keimfähigkeit von Saatgut langfristig erhalten bleiben, sind die Proben im Exsikkator aufzubewahren.

Vegetatives Pflanzenmaterial, das noch nicht eingefroren war, kann, sofern eine baldige Untersuchung vorgesehen ist, kurzfristig (wenige Tage) im Kühlschrank bei + 1°C bis + 4 °C aufbewahrt werden; die langfristige Lagerung von vegetativem Pflanzenmaterial z.B. als Rückstellprobe erfolgt bei -18°C bis -20°C im Gefrierschrank.

Das Auftauen und wieder Einfrieren der Proben sind ebenso wie lange Lagerzeiten in aufgetautem Zustand zu vermeiden.

**Anhang A:**

Beispiel eines Formulars für ein Probenahmeprotokoll für Pflanzenmaterial/ Saatgut (SOP2)

---

**I. Überwachung von Freilandversuchen mit gentechnisch veränderten Pflanzen**


---

Datum der Probenahme

**SAATGUT**

Anlaß der Probenahme

Abfüllung/ Aussaat/ Ernte/ Rückstellprobe/  
sonstiges:**Lieferung - Abfüllen -  
Probenahme**

Betreiber

Standort/e

Pflanze/ gentechnische Veränderung

AZ/ RKI

Lager- und Transportbedingungen

a) Lieferant des Saatgutes	ggf. Begleitschein vorlegen	Saatgutbehandlung
b) Menge und Bezeichnung des Saatgutes: <u>ursprüngliche Code-Nr.</u>	<u>Sorte, Linie</u>	<u>Konstrukt</u>
Besonderheiten/ Auffälligkeiten:		
c) Abfüllungsort und Firma		
d) Kontrolle der Abfüllung: Unterschrift des Verantwortlichen	e) Dokumentation geprüft: Unterschrift des Projektleiters	
f) Entnahme von Rückstellproben <i>Code-Nr. / Menge s. unter b)</i>	ja / Bei Abfüllung nein	Auf dem Feld Saatgut / Vegetationsproben
g) Bestätigung des Probenerhaltes: Unterschrift der Überwachungsbehörde	h) Bestätigung des Probeneingangs: Unterschrift Laborleiter	