

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik	
Probenahme von Pflanzenmaterial auf landwirtschaftlichen Anbauflächen zur Untersuchung von transgenen Anteilen in dort angebauten Kulturpflanzen	AM021
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, September 2006	
Status: verabschiedet	

1 Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode beschreibt die Probenahme von Pflanzenmaterial auf landwirtschaftlichen Anbauflächen zur Feststellung von transgenen Anteilen in dort angebauten Kulturpflanzen für eine später im Labor durchzuführende Prüfmethode. Es wird davon ausgegangen, dass als Prüfmethode eine quantitative Bestimmung der Transgenanteile mittels Realtime-PCR eingesetzt wird.

2 Kurzbeschreibung

Vor der Beprobung werden Informationen über die zu beprobende landwirtschaftliche Anbaufläche beschafft. Diese werden ausgewertet (s.Punkt 6.1) um zu prüfen, ob die betreffende Fläche grundsätzlich für eine Beprobung geeignet ist.

Die Probenahme von Pflanzenmaterial besteht aus drei Schritten. Diese sind:

- die nochmalige Prüfung der Fläche auf Eignung vor Ort und die Planung der Entnahme.
- die Entnahme von Probenmaterial, in der Regel von Pflanzenteilen, auf der landwirtschaftlichen Nutzfläche (Feldbeprobung)
- die Herstellung von Einzelproben und von Rückstellproben im analysierenden Labor

Aus den Einzelproben werden Laborproben hergestellt für die quantitative Untersuchung von transgenen Anteilen unter Anwendung einer Prüfmethode des analysierenden Labors.

3 Verweise auf zu beachtende Standardarbeitsanweisungen bzw. Empfehlungen

- Empfehlung der Kommission vom 04. Oktober 2004 für eine technische Anleitung für Probenahme und Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen und von aus gentechnisch veränderten Organismen hergestelltem Material als Produkte oder in Produkten im Kontext mit der Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 (2004/787/EG), Amtsblatt der EU L348/18-26 vom 24.11.2004
- Konzept zur Untersuchung von Saatgut auf Anteile gentechnisch veränderter Pflanzen. Unterausschuss Methodenentwicklung des Länderausschusses Gentechnik
<http://www.hamburg.de/Behoerden/Umweltbehoerde/gen/oeffentlich/methodensammlung/>
- Probenahme von Pflanzenmaterial Unterausschuss Methodenentwicklung des Länderausschusses Gentechnik www.lag-gentechnik.de
- ENISO/IEC 17025 Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien

4 Begriffsbestimmungen und Definitionen

Probenahme­fläche: Die landwirtschaftliche Anbaufläche, von der die nicht normierten Einzelproben (s. u.) entnommen werden. Dies ist die Anbaufläche selbst abzüglich der Fläche, die sich aus dem Mindestabstand (s. Punkt 6) zu der angrenzenden Vegetation ergibt. Die Probenahme­fläche ist eingeteilt in Teilflächen (s. u.)

Teilfläche: Ein Teil der Probenahme­fläche, in deren Mitte eine zuvor festgelegte Zahl von nicht normierten Einzelproben (s. u.) entnommen wird. Eine Probenahme­fläche ist in der Regel in mehrere gleiche Teilflächen aufgeteilt.

nicht normierte Einzelprobe: Eine Probe von einem Teil einer Pflanze oder die gesamte Pflanze selbst, die als Ausgangsmaterial für die Herstellung einer Einzelprobe verwendet wird.

Einzelprobe: Eine kleine und jeweils gleiche Menge (Masse) von Pflanzenmaterial, die nach der in Punkt 6.2 dargestellten Prozedur von verschiedenen Teilflächen entnommen und nach dem in 6.2.2 dargestellten Verfahren hergestellt .

Sammelprobe: Eine Probe, die sich aus einer bestimmten Anzahl von Einzelproben zusammensetzt, die vermischt worden sind. Die Anzahl der Einzelproben in der Sammelprobe sowie die Art und Weise der Vermischung wird bestimmt durch die eingesetzte Prüfmethode.

Laborprobe: Eine Teilmenge der Sammelprobe oder die gesamte Sammelprobe selbst, die zur Untersuchung auf transgene Bestandteile im Labor bestimmt ist. Größe und Beschaffenheit der Laborprobe werden bestimmt durch die jeweils angewandten Prüfmethode des Labors.

Analysenprobe: Eine Probe, die entweder aus der gesamten Laborprobe oder einer repräsentativen Teilmenge der Laborprobe besteht.

Rückstellprobe: Eine zweite Laborprobe, die gegebenenfalls für Nachuntersuchungen bestimmt ist.

Vertrauensbereich: Der Wertebereich, innerhalb dessen der Bezugswert mit einer Vertrauenswahrscheinlichkeit (meist 95%) liegt.

Erfassungsgrenze (limit of detection): Der kleinste Gehalt eines Analyten in einer Probe, der mit hoher Vertrauenswahrscheinlichkeit (meist $P = 95 \%$) nachgewiesen werden kann.

Bestimmungsgrenze (limit of Quantification): Der Konzentrationswert, bei dem die relative Standardabweichung eine vorgegebene Schranke (üblicherweise 33 %) unterschreitet. Die Bestimmungsgrenze entspricht dem niedrigsten Analytengehalt, der mit einer vorgegebenen Präzision quantifiziert werden kann. Sie stellt eine erweiterte Messsicherheit dar.

5 Materialien

5.1 Materialien für die Feldbeprobung:

- Probenahmedokumente gemäß Anhang II
- Ortungssystem zur katastermäßigen Identifizierung der Anbaufläche (GPS o. dgl.)
- Stangen zur Markierung der Probenahme­fläche und der Teilflächen
- Schreibmaterial: Kugelschreiber, wasserfester Filzstift, Papier

- Taschenrechner, gegebenenfalls Laptop mit Berechnungsprogramm zur Berechnung der Entnahmestellen
- Probenbehälter. Dies sind in der Regel verschließbare, z. B. ausreichend große Tiefkühlbeutel
- Sammelgefäße für Aufbewahrung und Transport der Probenbehälter, gegebenenfalls kühlbar oder gekühlt. Dies sind entweder geeignete Plastik- oder Kühlboxen
- ggf. beschriftbare Etiketten zur Kennzeichnung der Sammelgefäße

5.2 Materialien für die Herstellung der Einzelproben im Labor

- Schreibmaterial: Kugelschreiber, Papier
- wasserfester Filzstift
- Probenbehälter für die Aufbewahrung der Rückstellproben der Sammelproben. Dies sind in der Regel verschließbare zu beschriftende ungebrauchte PP-Beutel, z. B. ausreichend große Tiefkühlbeutel
- ggf. beschriftbare Etiketten zur Kennzeichnung der Sammelgefäße
- Schutzhandschuhe, steril
- Schneidbretter, steril
- Lochstanzen, steril
- Pinzetten
- Labormixer oder geeignete Mühle zur Homogenisierung der Sammelproben
- Mittel zur Dekontamination gemäß Laborplan

6 Durchführung der Probenahme

Grundsätzliche Erwägungen und vorbereitende Maßnahmen zur Entnahme der Proben:

Innerhalb der Gesamtheit der auf einer landwirtschaftlichen Fläche angebauten Kulturpflanzensorte ist nicht auszuschließen, dass diese transgene Anteile haben kann. Eine Ursache hierfür kann z. B. sein, dass das ausgebrachte Saatgut transgene Anteile enthalten hat. In der Regel sind die Anteile sehr gering. Sie liegen sehr häufig nahe bei der Erfassungsgrenze der eingesetzten Prüfmethode.

Es wird davon ausgegangen, dass die jeweils eingesetzte Prüfmethode geeignet ist für die quantitative Bestimmung des transgenen Anteils in dem zu analysierenden Pflanzenmaterial. Die Erfassungsgrenze liegt derzeit in der Größenordnung von 0,1 %. Die genaue Erfassungsgrenze der jeweils eingesetzten Prüfmethode wird im Rahmen eines Validierungsverfahrens vom jeweiligen Labor ermittelt und dokumentiert. Sie ist maßgebend für die Bemessung der zu untersuchenden Proben.

Hierzu müssen vor Beginn der Probenahme die folgenden Parameter definiert werden:

- Vertrauenswahrscheinlichkeit „p“ des Messergebnisses. Diese ist in der Regel 95 %.
- nachzuweisender transgener Anteil „r“. Dies ist in der Regel 0,1 %

Die Anzahl n der Einzelproben berechnet sich dann nach Definition dieser Parameter nach der Gleichung

$$n = \text{LOG}(1-(p/100))/\text{LOG}(1-(r/100)) \quad (1)$$

Zum Beispiel ergibt sich für die obige Regelannahme (p=95 %, r= 0,1 %) mit

$$\text{Gl. (1):} \quad n = \text{LOG}(1-(95/100))/\text{LOG}(1-(0,1/100))$$

eine Zahl n von 2995 Einzelproben.

Für die Probenahme selbst wird davon ausgegangen, dass die Verteilung der transgenen Kulturpflanzen auf der zu beprobenden Anbaufläche homogen ist. Um dennoch mögliche Einflüsse der Nachbarvegetation zu minimieren, sollten die einzelnen Entnahmepunkte in einem Mindestabstand von der Grenze der zu beprobenden Probenahmefläche liegen und möglichst gleichmäßig über die Probenahmefläche verteilt sein. Weiterhin sollte ein Mindestabstand von 10 m zu Anbauflächen, auf welchen potentielle Kreuzungspartner oder dieselben Sorten einer anderen Partie angebaut sind oder während derselben Vegetationsperiode angebaut wurden eingehalten werden. In der Regel kann davon ausgegangen werden, dass der Abstand von 10 m ausreichend ist. Besonderheiten sind zu berücksichtigen und können es je nach Fragestellung erforderlich machen, den Abstand zu erhöhen. Um Einflüsse der Nachbarvegetation auszuschalten, ist eine Probenahme vor der Blüte potentieller Kreuzungspartner empfehlenswert.

Prinzipiell ist unter Annahme einer homogenen Verteilung für eine Beprobung die nach Gleichung (1) berechnete Zahl von Einzelproben für die Herstellung einer Sammelprobe ausreichend. Es sollte aber abhängig von der Größe der landwirtschaftlichen Anbaufläche und möglichen sonstigen Faktoren geprüft werden, ob zur weiteren Absicherung der Probenahme eine von Gl. (1) abweichende Zahl von Einzelproben für die Herstellung von mehreren Sammelproben genommen werden soll.

6.1 Prüfung der Anbaufläche auf deren Eignung für die Probenahme

Zur Vorauswahl der Probenahmeflächen können soweit vorhanden bekannte Informationen ausgewertet werden. In der Regel muss aber eine Befragung der bewirtschaftenden Betriebe erfolgen. Hierzu kann auch ein Formular verwendet werden. Ein Beispiel für ein solches Formular ist in Anhang I für die Pflanzenart Raps dargestellt. Die Informationsauswertung ist vor allem dann notwendig, wenn die Anbaufläche, zu der eine Aussage hinsichtlich des Vorkommens gentechnisch veränderter Pflanzen getroffen werden soll, sich in mehrere Probenahmeflächen aufgliedert. Dies kann z. B. der Fall sein, wenn Teile der Anbaufläche sich für eine Probenahme nicht eignen und daher ausgeschlossen werden müssen.

Bei der Vorauswahl der Anbaufläche für eine Beprobung ist zu prüfen, ob neben dem nach Angaben des Betriebs verwendeten Saatgut, durch den gezielten oder unbeabsichtigten Eintrag sonstiges Saatgut auf die untersuchten Flächen gelangt ist, welches ebenfalls zum Eintrag gentechnisch veränderter Pflanzen geführt haben könnte. Dabei können vor allem die folgenden Eintragspfade in Frage kommen:

- 6.1.1 Aussaat einer weiteren Charge (Nachsaat bei Lücken, Aussaat auf Rest des Feldes)
- 6.1.2 Durchwuchs durch vorhandene Samen aus den vorangegangenen Jahren
- 6.1.3 Eintrag von Nachbarflächen
- 6.1.4 Eintrag aufgrund von Transportvorgängen auf angrenzenden Wegen
- 6.1.5 Eintrag durch die verwendeten Aussaatmaschinen
- 6.1.6 Eintrag durch sonstige Fahrzeuge

Zu diesen möglichen Eintragspfaden ist wie folgt vorzugehen:

Zu 6.1.1) Vom bewirtschaftenden Betrieb ist zu erfragen, ob eine Nachsaat stattgefunden hat. Wenn ja, so kann die Fläche für eine Beprobung nur dann herangezogen werden, wenn der Bereich auf dem die Nachsaat stattgefunden hat, sicher abgrenzbar ist. Unter Verwendung eines zusätzlichen Sicherheitsabstandes sind die Flächen für die Beprobung weiter verwendbar.

Zu 6.1.2) Aufgrund der Angaben des bewirtschaftenden Betriebes zur Aussaat einer Sorte wie z. B. von Raps in den Vorjahren auf den betroffenen Flächen und hinsichtlich des Befundes der Feldbeschauung durch eine in der landwirtschaftlichen Anbaupraxis sachkundige Person ist zu entscheiden, ob Durchwuchs auf der zu untersuchenden Fläche zu erwarten ist. Des Weiteren wird in Punkt 6.2 dieser Methode festgelegt, dass keine Einzelpflanzen außerhalb der Saatzeilen beprobt werden.

6.1. 3 und 6.1.4) Von den Feldrändern wird bei der Festlegung der Beprobungspunkte ein Sicherheitsstreifen gemäß den in diesem Konzept gemachten Vorgaben nicht zur Probenahme herangezogen.

Zu 6.1.5) Die Angaben des bewirtschaftenden Betriebes hinsichtlich der verwendeten Aussaatmaschinen und verwendeter anderer Chargen sind für die Entscheidung, ob relevante Mengen sonstigen Saatgutes auf den Feldern ausgebracht wurden, maßgebend.

Zu 6.1.6) In der Regel werden keine Einzelpflanzen außerhalb der Saatzeilen beprobt.

6.2.1 Auf dem Feld durchzuführende Maßnahmen (Feldbeprobung):

Vor-Ort-Prüfung der Anbaufläche auf die Eignung zur Probenahme, Probenahmedokumente:

Alle Maßnahmen der Probenahme sind zu dokumentieren. Hierfür ist das für die Feldbeprobung vorgesehene Protokollformular im Anhang II dieser Methode zu verwenden .

Die Vor-Ort Prüfung der Anbaufläche sollte von einer in der landwirtschaftlichen Anbaupraxis sachkundigen Person vorgenommen werden... Hierbei sind insbesondere die schon bei der Vorauswahl der Flächen unter den Punkten 6.1.1 bis 6.1.6 geprüften Faktoren nun vor Ort nachzuprüfen, zu verifizieren und gegebenenfalls zu korrigieren. Anbauflächen, auf welchen Durchwuchs oder Nachsaat erkennbar sind, sind in der Regel von der Beprobung ganz oder in bestimmten betroffenen Arealen auszuschließen. Das Ergebnis der Inaugenscheinnahme durch die sachkundige Person ist im Teil I " Angaben zur Inaugenscheinnahme der Anbaufläche durch den landwirtschaftlichen Sachkundigen " des Protokollformulars zu dokumentieren.

Teil II " Angaben zum landwirtschaftlichen Betrieb" des Protokollformulars im Anhang II dieser Methode ist in Gegenwart der für die Leitung des landwirtschaftlichen Betriebes verantwortlichen Person oder deren Stellvertretung vor Ort, d. h. bei der zu beprobenden landwirtschaftlichen Nutzfläche auszufüllen. Die Angaben sind von der Betriebsleitung mit Unterschrift und Datum zu bestätigen.

Der Teil III "Angaben zur Probenahme" des Protokollformulars ist von der für die Probenahme verantwortlichen Person auszufüllen.

Festlegung der Probenahmefläche und der Teilflächen

Wenn die Prüfung vor Ort ergeben hat, dass die Anbaufläche für eine Probenahme geeignet ist, ist die eigentliche Probenahmefläche mit den Abmessungen Länge $l_{\text{Probefläche}}$ X Breite $b_{\text{Probefläche}}$ festzulegen. Die Probenahmefläche ist so auszuwählen, dass der empfohlene Mindestabstand zu angrenzenden Flächen eingehalten wird. In der Regel ist ein Mindestabstand von 10 m nach allen Seiten ausreichend.

Die Probenahmefläche ist an ihren Eckpunkten zu markieren. Dabei ist eine Ecke als Bezugspunkt (= Referenzpunkt) auszuwählen und zu kennzeichnen. Nach Erfassen der Probenahmefläche ist diese in möglichst gleiche Teilflächen aufzuteilen. Sofern es die Abmessungen der Probefläche zulassen, sind Teilflächen mit gleicher Kantenlänge

(Quadrate) festzulegen. Von den Teilflächen werden, nach deren Berechnung die nicht normierten Einzelproben in der zuvor festgelegten Zahl entnommen. Die Anzahl $n_{\text{Teilflächen}}$ der Teilflächen richtet sich nach der Gesamtzahl der Einzelproben (n) unter der Berücksichtigung der auf jeder Teilfläche zu entnehmenden Zahl n_t von Einzelproben mit

$$n_{\text{Teilflächen}} = (n / n_t) \quad (2)$$

aus der Probenahmeffläche und der Anzahl der Teilflächen ist dann die durchschnittliche Größe $A_{\text{Teilfläche}}$ einer Teilfläche zu berechnen mit

$$A_{\text{Teilfläche}} = \text{Probenahmeffläche} / n_{\text{Teilfläche}} \quad (3)$$

Aus der Größe der Teilfläche ist dann die Seitenlänge l und b zu berechnen. Für den anzustrebenden Fall einer quadratischen Teilfläche mit $l = b$ gilt dabei

$$l = b = \text{Wurzel}(A_{\text{Teilfläche}})$$

Danach ist die Zahl der Teilflächen in Längsrichtung sowie in Querrichtung zu berechnen. Für quadratische Teilflächen ist wie folgt zu verfahren:

für die Längsrichtung ist die Zahl der Teilflächen

$$n_{\text{Teilfläche längs}} = l_{\text{Probefläche}} / \text{Wurzel}(A_{\text{Teilfläche}}) \quad (4)$$

für die Querrichtung ist die Zahl der Teilflächen

$$n_{\text{Teilfläche quer}} = b_{\text{Probefläche}} / \text{Wurzel}(A_{\text{Teilfläche}}) \quad (5)$$

Bei sehr schmalen Anbauflächen kann es nach Abzug des Mindestabstandes möglich sein, dass sich in Querrichtung nur eine Teilfläche bei dieser Berechnung ergibt.

Dies ist dann entsprechend bei der Berechnung zu berücksichtigen. Zur Berechnung kann es hilfreich sein, auf ein entsprechendes Kalkulationsprogramm, das vorher erstellt wurde, zurückgreifen zu können. Ein Beispiel für ein solches Programm befindet sich im Anhang III dieser Methode.

Die Festlegungen sind auf einer Skizze im Probenahmeprotokoll zu dokumentieren. Dabei sind die Lage der Probenfläche im Schlag, der Referenzpunkt, der Startpunkt für den Probenehmer sowie Anzahl und Abmessung der Teilflächen zu kennzeichnen.

Vor der eigentlichen Entnahme der nicht normierten Einzelproben ist ein Startpunkt für den Probenehmer mit Bezug auf den Referenzpunkt festzulegen. Ist bei sehr vielen zu entnehmenden Einzelproben der Einsatz mehrerer Probenehmer erforderlich, so sind deren Startpunkte in sinnvoller Weise festzulegen und zu dokumentieren. Die Einzelproben sollen in der Mitte einer jeweiligen Teilfläche entnommen werden. Demzufolge ergibt sich der Startpunkt für die erste Probenahme in einer Entfernung

von $1/2 * l$ in Längsrichtung und $1/2 b$ in Querrichtung von dem Referenzpunkt entfernt.

Mit der Festlegung dieses Startpunktes können alle weiteren Probenahmepunkte in der Mitte der jeweiligen Teilflächen in einer Entfernung von ganzzahligen Vielfachen von l in Längsrichtung bzw. von b in Querrichtung angelaufen werden.

Bei großen Probeflächen, kann es zur besseren Richtungsorientierung der Probenehmer erforderlich sein, die Reihen der einzelnen Teilflächen in übersichtlichen Abständen zusätzlich zu markieren. Eine einfache Methode hierfür ist das Einstecken von Stangen in der Mitte der Teilflächen in angemessenen Abständen.

Durchführung der Probenentnahme

Nach der Festlegung der Teilflächen werden in deren Mitte die nicht normierten Einzelproben in der zuvor festgelegten Zahl genommen. Es sind hierfür normale, für die Kultur typische Pflanzen auszuwählen. Pflanzen außerhalb der Saatzeilen sind von der Probenentnahme auszuschließen. Von diesen wird ein Teil der Pflanze als nichtnormierte Einzelprobe entnommen. In der Regel werden Blätter von den jeweiligen Pflanzen entnommen. Wenn möglich sollten die entnommenen Pflanzenteile frei von anhaftender Erde oder sonstigem Material sein.

Um Streuungen bei der späteren Herstellung der Einzelproben im Labor zu minimieren, sollen hierzu bei Blattpflanzen wie zum Beispiel Raps mittlere Blätter gleicher Größe ausgewählt werden. Wenn nicht anders festgelegt, wird pro Pflanze ein solches Blatt als nicht normierte Einzelprobe entnommen. Die Aufbewahrung der einzelnen Blätter erfolgt in einem Plastikbeutel, z. B. einem Tiefkühlbeutel oder . Gegebenenfalls sind die Beutel nach dem Einsammeln und während des Transportes zum Labor zu kühlen.

6.22 Herstellung der Einzelproben im Labor (Konfektionierung zu Einzelproben)

Für die Herstellung der Einzelproben sind die im Labor geltenden Standardarbeitsanweisungen zu beachten.

Die auf der Anbaufläche gesammelten unkonfektionierten Einzelproben werden im Labor zunächst von anhaftendem Material gereinigt und dann zu Einzelproben konfektioniert. Aus diesen wird dann in der Regel eine Sammelprobe hergestellt. Abhängig vom Untersuchungsverfahren kann es auch erforderlich sein, mehrere Sammelproben herzustellen. Ist dies der Fall, so wird bei deren Herstellung wie bei der Herstellung einer einzelnen Sammelprobe verfahren. Aus den Sammelproben werden die einzelnen Laborproben gemäß den Angaben in der jeweils anzuwendenden Prüfmethode für die weitere Analyse hergestellt.

Reinigung des Pflanzenmaterials und Herstellung der Einzelproben:

Bei Blattmaterial werden die einzelnen Blätter falls erforderlich zunächst an der Oberfläche mit reichlich Wasser zur Entfernung von anhaftendem Material gereinigt. Die gereinigten Blätter werden dann in zwei ungefähr gleiche Hälften zerteilt. Eine Hälfte davon wird zur Herstellung einer Rückstellprobe abgezweigt und gemäß dem Stand der Technik aufbewahrt.¹⁾

Die anderen Hälften werden zur Herstellung von Einzelproben wie folgt verarbeitet: Von den Blatthälften ist eine bestimmte und jeweils gleiche Menge von Material für die Herstellung von Einzelproben zu verwenden. Die Gesamtmasse einer Einzelprobe ist für die Untersuchung in der Regel von untergeordneter Bedeutung. Wichtig ist aber, dass alle Einzelproben jeweils die gleiche Masse haben. Eine einfache, hinreichend genaue und leicht durchführbare Methode hierfür ist das Ausstanzen stets gleicher Flächenanteile eines Blattes für eine Einzelprobe. Es kann in der Regel davon ausgegangen werden, dass pro Einzelprobe eine Blattfläche in der Größenordnung von 1 cm² ausreichend ist.

Die so gewonnenen Einzelproben werden zu einer oder mehreren Sammelproben zusammengeführt und dann in einer geeigneten Weise homogenisiert. Die Anzahl der Einzelproben in einer Sammelprobe entspricht in der Regel der nach Gl. (1) berechneten Probenzahl. Aus den Sammelproben sind anschließend Laborproben herzustellen. Die Größe der Laborproben sowie die weitere Behandlung einschließlich der Homogenisierung richtet sich nach der eingesetzten Prüfmethode.

¹⁾ Die Aufbewahrung der Rückstellproben erfolgt in der Regel tiefgekühlt. Die auf die beschriebene Weise gewonnenen Rückstellproben sind nicht normierte Einzelproben, die im Falle einer Untersuchung wie oben beschrieben wie Einzelproben normiert werden müssen. Dabei ist zu beachten, dass bei bestimmten Pflanzenarten das Blattmaterial durch Einfrieren so weit zersetzt werden kann, dass die Normierung von Einzelproben durch Blattstanzen nicht mehr möglich ist. Eine Alternative dazu wäre das bei großen Zahlen von Einzelproben sehr umständliche und zeitraubende Einwiegen von Einzelproben stets gleicher Masse. Bei derartigen Pflanzenarten kann es daher angebracht sein, die Rückstellprobe aus bereits normierten Einzelproben zusammenzustellen und dann erst zur Aufbewahrung einzufrieren. Dies ist z. B. angebracht für alle Rapssorten.