

Abschlussbericht
der durch die Max-Buchner-Forschungstiftung (MBFSt)
geförderten Forschungsarbeit

Einfluss der genetischen Konstitution von Samen auf die Quantifizierung von GVO- Anteilen in Saatgut

(Kennziffer 2573)

Abstract:

Die in unterschiedlichen Pflanzenarten ausgebildeten Samengewebe können bei der Bestimmung von Transgenanteilen mittels der Real-Time-PCR-Methode einen Einfluss auf die Messergebnisse haben. Während bei den dikotylen *Brassicaceen* keine signifikanten Unterschiede zwischen der Vererbung einer transgenen Eigenschaft durch weibliche oder männliche Gameten festgestellt werden konnten, waren bei *Poaceen* Unterschiede feststellbar.

Stipendiat:

Dipl. Ing. agr. Peter Westermeier

Antragsteller:

Prof. Dr. Gerhard Wenzel

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan
Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung
Am Hochanger 2
85350 Freising-Weihenstephan

1. Einleitung

Für Lebens- und Futtermittel wurde im Jahr 2003 ein Kennzeichnungsschwellenwert für unbeabsichtigte Beimengungen von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) in Höhe von 0,9 % vom europäischen Parlament beschlossen und in der EU-Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 festgeschrieben. Diese Regelung wurde mittlerweile im Zuge der Novelle des deutschen Gentechnikgesetzes in nationales Recht umgesetzt. Sowohl auf EU-Ebene als auch auf Bundesebene wurden dabei keine Regelungen bezüglich eines Kennzeichnungsschwellenwerts für Saatgut getroffen, eine Entscheidung hierüber steht immer noch aus. Dadurch herrscht für die Saatgutwirtschaft nach wie vor Rechtsunsicherheit, da die Behörden bislang widersprüchlich reagierten, wenn in Saatgut Spuren von gentechnisch veränderten Organismen gefunden wurden.

Vertreter des ökologischen Landbaus fordern für konventionelles Saatgut die Einführung eines Schwellenwertes in Höhe der technischen Nachweisgrenze von 0,1 %. Saatgutproduzenten befürchten bei einer Ausweitung des GVO-Anbaus derartige Grenzwerte nicht einhalten zu können und fordern daher für konventionelles Saatgut Grenzwerte zwischen 0,3 und 0,7 %, der Bundesverband deutscher Pflanzenzüchter e.V. (BDP) in einem Positionspapier sogar 0,9 %, da Saatgut nicht in einem geschlossenen System produziert werden kann und daher bei einem zugelassenen Anbau keine 100 %-ige Reinheit zu gewährleisten ist.

Im August 2007 wurde Rapssaatgut in Deutschland zurückgerufen, das in einer GVO-Analyse positiv getestet wurde, wenn auch in sehr geringen Anteilen unterhalb der quantitativen Bestimmungsgrenze von 0,1 %. In weiteren Analysen konnten keine GVO-Anteile nachgewiesen werden. Dieser Vorgang zeigt wiederum die Notwendigkeit eines Kennzeichnungsschwellenwertes für Saatgut um kostenintensive und imageschädigende Rückrufaktionen für die Züchtungsunternehmen zu minimieren und Rechtssicherheit für die Überwachungsbehörden zu schaffen. Diese Studie soll dabei in der aktuellen Diskussion einen Beitrag zur wissenschaftlichen Bewertung von Saatgutuntersuchungen liefern.

Pflanzliches Saatgut besitzt aufgrund von Fremdbefruchtungseignissen und Polyploidie eine hohe genotypische Variabilität. Heterozygote und homozygote Zustände können bei fremdbefruchtenden Pflanzenarten gleichzeitig in den Pflanzensamen vorliegen. Dies stellt hohe Anforderungen an die Beurteilung von DNA-basierten Analyseergebnissen, die daher sehr differenziert bewertet werden müssen. Insbesondere die genetische Konstitution des Samengewebes ist von Spezies zu Spezies unterschiedlich.

Der erste Unterschied ist im unterschiedlichen zytologischen Aufbau der verschiedenen Samengewebe und deren Ursprung begründet. Zum Zeitpunkt des Eindringens des Pollenschlauchs in den Embryosack löst sich eine der Synergiden auf. Es folgt

die Auflösung der Pollenschlauchspitze, so dass zwei Spermakerne in den Embryosack übertreten können. Ein Spermakern vereint sich mit dem Eizellkern, es entsteht die diploide Zygote, aus der sich der Embryo entwickelt. Der zweite Spermakern vereint sich mit dem diploiden Polkern und bildet ein triploides Fusionsprodukt aus dem sich das Endosperm entwickelt. Testa, Perikarp und Aleuronschicht, die zusammen die Samenhülle bilden werden aus rein mütterlichem Gewebe gebildet und besitzen damit auch die gleiche Ploidiestufe wie die Mutterpflanze. Somit sind in Endosperm und Samenhülle Unterschiede festzustellen, je nach dem, ob eine transgene Eigenschaft von den männlichen oder weiblichen Gameten vererbt wurde. Wurde eine nicht-transgene Mutterpflanze mit transgenem Pollen einer homozygot transgenen Pflanze bestäubt, trägt der diploide Embryo die transgene Eigenschaft auf einem der beiden Chromosomensätze, das triploide Endosperm auf einem der drei Chromosomensätze und die Samenschale ist nicht-transgen. Wird hingegen eine homozygot transgene Mutterpflanze mit nicht-transgenem Pollen bestäubt trägt der Embryo wiederum die transgene Eigenschaft auf einem der beiden Chromosomensätze, das Endosperm auf zwei der drei Chromosomensätze und die diploide Samenschale besitzt die gleiche genetische Konstitution wie die Mutterpflanze und ist damit homozygot-transgen.

Ein weiterer Punkt, der zu berücksichtigen ist, ergibt sich aus der unterschiedlichen morphologischen Zusammensetzung von Samenkörnern verschiedener Pflanzengattungen.

Bei Raps (*Brassica napus* L.) Fam. *Brassicaceae*, einer dikotylen Pflanzenfamilie, besteht der größte Teil des Samens (82 %) aus dem bei der Befruchtung entstandenen diploiden Embryo mit den Kotyledonen (FOWLER & DOWNEY, 1970). Das bei der doppelten Befruchtung entstandene triploide Endosperm hat bei *Brassicaceen* nur in frühen Entwicklungsstadien des Samens eine Bedeutung als Nährgewebe für den sich entwickelnden Embryo, und wird bis zur Samenreife fast vollständig zurückgebildet. In Abwesenheit eines extraembryonalen Nährgewebes erfolgt die Einlagerung der Reservestoffe bei allen *Brassica*-Arten in den Kotyledonen und bedingt dadurch deren hohen Anteil am gesamten Samenkorn. Die Samenhülle (Testa und Aleuronschicht) besitzt deshalb nur einen Gewichtsanteil von 18 % am gesamten Samenkorn (FOWLER & DOWNEY, 1970).

Bei den monokotylen *Poaceen*, zu denen alle wirtschaftlich bedeutenden Getreidearten zählen, dient das bei der doppelten Befruchtung entstehende triploide Endosperm als Speichergewebe des Samens (Karyopse). Das Endosperm nimmt einen Anteil zwischen 79 und 94 % des gesamten Samenkorns ein, der diploide Embryo zwischen 1,15 und 3,00 % und die aus dem mütterlichen Gewebe gebildete Samenschale zwischen 5,5 und 18,3 % (SIMMONDS, 1978).

Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau eines Maiskorns mit den unterschiedlichen Ploidiestufen der einzelnen Gewebe und deren Gewichtsanteile am gesamten Korn.

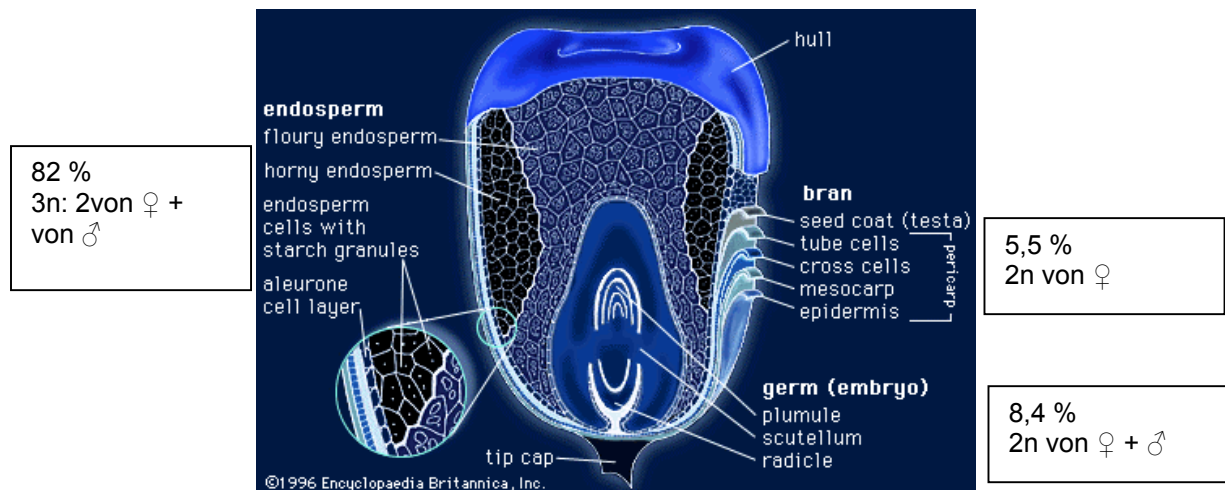


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Maiskorns mit Gewichtsanteilen und Ploidiestufen der einzelnen Gewebe

Die je nach Pflanzenart unterschiedlichen Gewichtsanteile der einzelnen Gewebe am Gesamtaufbau eines Samenkorns und die in der Entwicklung begründeten unterschiedlichen Ploidiestufen der einzelnen Gewebe können daher die Quantifizierung von Transgenanteilen in Samenmaterial bei Auskreuzungsereignissen entscheidend beeinflussen.

2. Material und Methoden

Für die Untersuchungen der Unterschiede in den Samen von Nachkommen transgener Pflanzen wurde als Vertreter einer dikotylen Pflanzenart Raps (*Brassica napus* L.) ausgewählt, als Vertreter einer monokotylen Pflanzenart Mais (*Zea mays* L.). Die reziproken Kreuzungen wurden bei Raps mit der transgenen Liniensorte Modul^{LL} (Transformationsereignis GS40/90) und ihrer isogenen Ausgangslinie Falcon durchgeführt. Bei Mais wurden die reziproken Kreuzungen zwischen der Hybridsorte Monopol und einer transgenen Experimentalhybride (T-25) durchgeführt. Beide transgene Arten sind Träger des *pat*-Gens (Phosphinotricin-Acetyltransferase), das der Pflanze die Eigenschaft verleiht, gegen das Totalherbizid Basta[®] (Wirkstoff D,L-Phosphinotricin) resistent zu sein. Die eingeführte Nucleinsäure enthält neben dem Phosphinotricin-Acetyltransferase-Gen (*pat*-Gen) den 35S-Promotor und Terminator des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV). Die transgene Eigenschaft ist damit in beiden Arten mit dem gleichen PCR-Nachweisverfahren detektierbar. Die Real-Time-PCR-Analysen erfolgten mit Hilfe der TaqMan[®]-Technik (HOLLAND *et al.*, 1991) unter Verwendung Fluoreszenzfarbstoff-markierter Sonden (LEE *et al.*, 1993).

Tabelle 1 zeigt die Sequenzen der für die Analysen verwendeten Oligonukleotide und Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sonden. Ein PCR-Nachweis diente dem spezifischen Nachweis von Raps-DNA mit Hilfe sequenzspezifischer Oligonukleotide für die Glycosyltransferase (s_gt-TM-f bzw. s_gt-TM-r). Die Oligonukleotidpaare ivr-TM-for und ivr-TM-rev dienten dem spezifischen Nachweis von Mais und die Oligonukleotide pat-TM-for und pat-TM-rev dienten dem Nachweis der transgenen DNA-Sequenz der Transformationsereignisse T-25 bzw. GS40/90.

Tabelle 1: Für die Real-Time-PCR-Analysen eingesetzte Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Quelle
ivr-TM-for	TCC GCT GTA TCA CAA GGG CT	unveröffentlicht
ivr-TM-rev	TGG CCC CAG GTG ATG TTG	unveröffentlicht
ivr-TM-p	FAM-TAC CAC CTC TTC TAC CAG TGG AAC CCG G-TAMRA	unveröffentlicht
s_gt-TM-f	GTC CAG TTC GCT AAA CGC CTA GT	BLOCK & SCHWARZ, 2003
s_gt-TM-r	GAG GCG GTG TAG GTG GTG G	BLOCK & SCHWARZ, 2003
s_gt-TM-p	VIC-CCA AAG GCG TCA AAG TCA CAA TCG C-TAMRA	BLOCK & SCHWARZ, 2003
pat-TM-f	TAG CTG GCC TAA TCT CAA CTG GTC	BLOCK & SCHWARZ, 2003
pat-TM-r	ATT TCA TTT GGA GAG GAC AGG GTA C	BLOCK & SCHWARZ, 2003
pat-TM-p	FAM-CCT CTC CGG AGA CAT GTC GAC TCT AGA GGA T-TAMRA	BLOCK & SCHWARZ, 2003

Die Real-Time-PCR-Untersuchungen wurden bei Mais sowohl an jeweils sieben Einzelkörnern als auch an Mischproben von je 10 Körnern durchgeführt. Bei Raps wurde aufgrund des geringen Gewichts eines einzelnen Kornes auf eine Einzelkornanalyse verzichtet. Dazu wurde jeweils genomische DNA nach einer modifizierten CTAB-Methode isoliert (AUSUBEL *et al.* 1999).

Die Transgenität der Kreuzungsprodukte wurde zum Nachweis der erfolgreichen Kreuzung an Stichproben mit Hilfe eines Biotests überprüft. Dazu wurden Samenproben zur Keimung gebracht und anschließend im Zwei- bis Vierblattstadium mit einer entsprechenden Herbizidlösung behandelt (VAN HOEF *et al.* 1998; SHIRAI *et al.* 1998). F1-Raps-Nachkommen der transgenen Rapspflanzen wurden geselbstet, um über eine Spaltungsanalyse der F2-Generation den Kreuzungserfolg nachzuweisen.

3. Ergebnisse und Diskussion

Zur Durchführung reziproker Kreuzungen wurden im Gewächshaus transgene und nicht-transgene Raps- (*Brassica napus* L.), und Maispflanzen (*Zea mays* L.) zur Blüte gebracht. Sowohl bei Mais als auch bei Raps ergab sich ein ausreichend überlappendes Blütenfenster von transgenen und nicht-transgenen Pflanzen, um erfolgreich reziproke Kreuzungen durchführen zu können. Bei den Kreuzungen der Maispflanzen konnte ein guter Kornansatz erzielt werden. Hier wurden 528 (Mutterlinie transgen) bzw. 412 (Vaterlinie transgen) Körner geerntet. Die künstlichen Befruchtungen bei Raps zeigten einen geringen Kornansatz, bei den Kreuzungen wurden 29 (Mutterlinie transgen) bzw. 22 (Vaterlinie transgen) Rapskörner erzeugt. Diese Anzahl war jedoch auch hier für die durchzuführenden Analysen ausreichend.

Jeweils 10 Pflanzen der heterozygoten F1-Generation von Raps wurden im Gewächshaus ausgesät und im 4-Blatt-Stadium einem sog. Biotest unterzogen. In diesem Fall wurden die Pflanzen zweimal mit einer 1 %-igen Lösung des Herbizids Phosphinotricin behandelt und nach ca. 2 Wochen bonitiert. Alle Rapspflanzen überlebten die Herbizidbehandlung. Für Raps erlaubte dies die Aussage, dass alle Kreuzungsprodukte transgen waren. Für die Kreuzungen, in denen die Mutterpflanzen nicht transgen waren, konnte somit gezeigt werden, dass die Kreuzungen erfolgreich waren und keine Selbstung der Mutterpflanzen erfolgt ist. Für die Kreuzungen, in denen die Mutterpflanzen transgen waren, wurde eine Spaltungsanalyse in der F2-Generation durchgeführt. Dazu wurde erneut ein Biotest durchgeführt. Da das transgene Rapsmaterial Modul^{LL} ursprünglich zwei unabhängig voneinander vererbte Kopien des transgenen Konstruktes trug, war im Biotest ein phänotypischer Transgenanteil von 93,75 % zu erwarten. Die Verteilung der Genotypen in der F2-Generation kann daher als dominant-rezessiver Erbgang nach Mendel beschrieben werden (siehe Tabelle 2). Es wurden ca. 3.000 F2-Rapskörner untersucht und das Ergebnis entsprach annähernd dem erwarteten Ergebnis, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch hier die durchgeführten Kreuzungen erfolgreich waren.

Tabelle 2: Kreuzungsschema bei Selbstung der F1-Generation von Modul^{LL}

	P	P	p	p
	P	p	P	p
P	PP	PP	Pp	Pp
P	PP	Pp	PP	Pp
P	PP	PP	Pp	Pp
p	pP	pp	pP	pp
p	pP	pP	pp	pp
P	PP	Pp	PP	pP
p	pP	pP	pp	pp
p	pP	pp	pP	pp

Die Ergebnisse der 'real-time' PCR Experimente aus Pools von jeweils 10 Rapskörnern sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Messung erfolgte in zwei Wiederholungen, daraus wurden jeweils Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Tabelle 3: Transgenanteile der reziproken Kreuzungen von Raps

Probe	n	Transgenanteil real-time PCR* [%]	Standardabweichung [%]	Transgenanteil Biotest* [%]
♀Falcon x ♂Modul	2	68,20	4,50	100
♀Modul x ♂Falcon	2	71,28	8,97	100

* Die quantitative PCR berücksichtigt die Allelfrequenz in der heterozygoten F1-Generation, während der Biotest 'nur' das Genprodukt unabhängig von der genetischen Konstitution erfasst.

Die ermittelten Unterschiede zwischen den beiden reziproken Kreuzungen waren nicht signifikant, bestätigen jedoch tendenziell die Hypothese eines höheren Transgenanteils bei den Körnern, die die transgene Eigenschaft von der Mutter vererbt bekamen. Bei Raps (*Brassica napus* L.) besteht der größte Teil des Samens (82 %) aus dem bei der Befruchtung entstandenen diploiden Embryo mit den Kotyledonen, d.h. ein Anteil von ca. 18 % entfällt auf die aus rein mütterlichem Gewebe gebildete Samenhülle. Der Anteil des bei der Befruchtung gebildeten triploiden Endosperms kann bei ausgereiften Rapskörnern vernachlässigt werden, da es bis zur Samenreife fast vollständig zurückgebildet wird. Wie bereits die morphologische Zusammensetzung von Rapskörnern erwarten lässt, sind die Unterschiede bei Rapskörnern gering, da der Großteil des Samenkorns die gleiche genetische Konstitution besitzt, unabhängig von welchem Elter die transgene Eigenschaft weitergegeben wurde. Die Mittelwerte liegen mit 68,2 % und 71,28 % über dem erwarteten Wert von ca. 50 %. Der Grund dafür liegt vermutlich in der unterschiedlichen PCR-Effizienz der beiden miteinander verrechneten PCR-Systeme pat und s_gt. Dadurch wird der Transgenanteil über alle Proben gleichmäßig überschätzt.

Jeweils 10 Maiskörner der beiden reziproken Kreuzungen wurden im Gewächshaus ausgesät und im 4-Blatt-Stadium einem sog. Biotest unterzogen. Da nicht alle Maispflanzen überlebten (in beiden Fällen war annähernd die Hälfte der aufgelaufenen Pflanzen nach der Herbizidbehandlung abgestorben), muss angenommen werden, dass bei der Erstellung zur Verfügung stehenden T-25 Experimentalhybride nur ein Elternteil die transgene Eigenschaft eingebracht hat. Jedenfalls war dieses Ergebnis nur mit den in Abbildung 2 angenommenen genetischen Konstitutionen zu erklären.

Dies erklärt auch die sehr differierenden Ergebnisse, die bei der Real-Time-PCR der F1-Nachkommenschaft erzielt wurden.

Zunächst wurden jeweils 10 Körner gemeinsam vermahlen und in einer Real-Time-PCR-Analyse untersucht (Ergebnisse in Tabelle 2 dargestellt). Da diese Ergebnisse nicht dem erwarteten Ergebnis entsprachen, wonach die Körner, die die transgene Eigenschaft von der Mutterpflanze vererbt bekamen, einen höheren Transgenanteil aufweisen sollten, wurde angenommen, dass bei den gemeinsam vermahlenden Körnern ein Ungleichgewicht der jeweils 2 möglichen genetischen Konstitutionen vorlag. Daher wurden anschließend noch jeweils 7 Körner einzeln untersucht. Dabei lassen sich die Ergebnisse für die jeweiligen Kreuzungen in zwei Gruppen einteilen (siehe Tabelle 4). Eine Gruppe besitzt jeweils extrem niedrige Transgenanteile, die zweite Gruppe besitzt dagegen Werte ungefähr in Höhe der erwarteten Transgenanteile.

Der Grund dafür ist wiederum im heterozygoten Verhalten der transgenen Eigenschaft zu sehen. Dadurch wurden bei beiden reziproken Kreuzungen auf jeder Pflanze sowohl transgene als auch nicht-transgene Gameten gebildet. Die untersuchten Körner in Gruppe 1 entstanden deshalb aus der Befruchtung mit transgenen Pollen (mittlerer Transgenanteil 53,56 %), während die Körner der Gruppe 2 aus der Bestäubung mit nicht-transgenem Pollen hervorgingen. Die gemessenen Transgenanteile in Höhe von 0,12 % in diesen Proben stammen vermutlich von anhaftendem Staub an der Oberfläche der Körner, da diese vor der DNA-Isolation nicht abgewaschen wurden.

Die Körner aus Gruppe 3 entstanden aus einem transgenen weiblichen Gameten und sollten folglich 2 Kopien des transgenen Konstrukts im Endosperm tragen, 1 Kopie im Embryo und 1 Kopie in der Samenschale. Dies zeigt sich auch im gemessenen Transgenanteil in Höhe von 96,29 %.

Folglich sind die Körner aus Gruppe 4 aus einem nicht-transgenem weiblichen Gameten entstanden. Diese Körner tragen daher nur in der Samenschale (wie die Mutterpflanze) die transgene Eigenschaft in heterozygoter Form, was im Mittel einen Transgenanteil von 1,31 % des gesamten Korns ergibt.

Abbildung 2 zeigt schematisch die vier verschiedenen genetischen Konstitutionen die aus den reziproken Kreuzungen hervorgegangen sind, sowie die genetischen Konstitutionen der Kreuzungseltern.

Vor dem Hintergrund dieser Information, sind die Ergebnisse der ebenfalls untersuchten, gepoolten Proben nicht zu deuten, da von den 10 gemeinsam vermahlenden Körnern jeweils eine unbekannte Menge einen hohen bzw. niedrigen Transgenanteil besaß. Aus diesem Grund liegt bei den gepoolten Proben der Transgenanteil bei der Weitergabe der transgenen Eigenschaft über die Pollen wider erwarten über dem Transgenanteil der Nachkommen aus der Weitergabe über die weiblichen Gameten.

Die mittleren Transgenanteile von 53,56 % und 96,29 % sind in den Berechnungen überschätzt, da als Referenzmaterial ebenfalls der T-25 Kreuzungselter verwendet wurde und dieser die transgene Eigenschaft nicht homozygot trug, wie zunächst angenommen wurde.

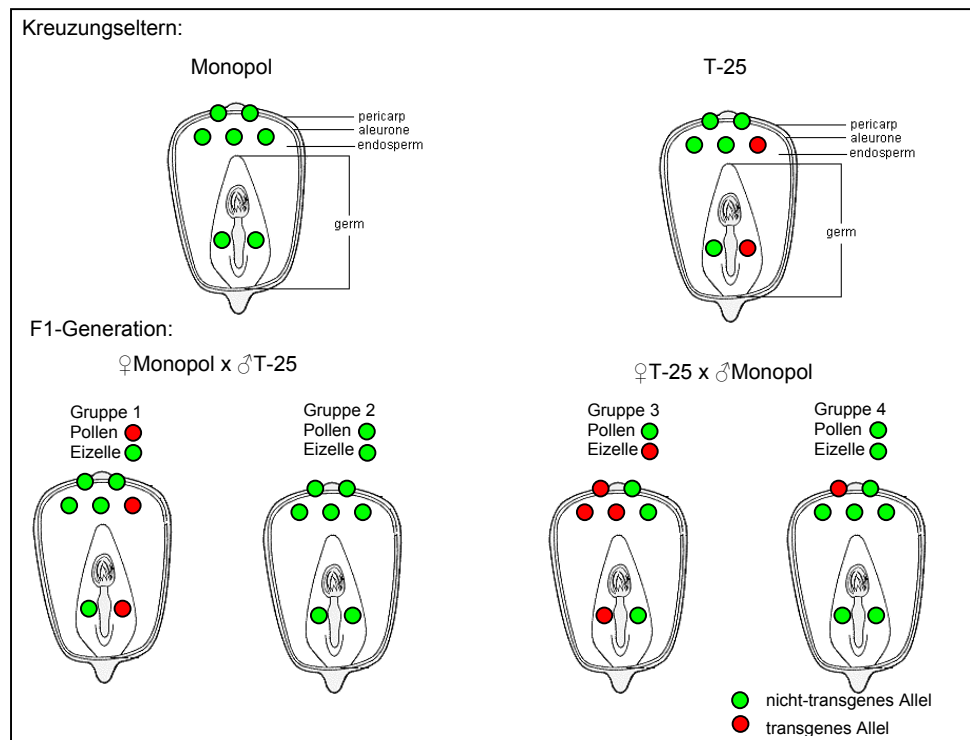


Abbildung 2: genetische Konstitution von Maissamen

Der Nachweis der dominant vererbten, transgenen Eigenschaft Herbizidtoleranz kann über Biotests oder quantitative PCR erfolgen. Bei einem Biotest wird unabhängig von der genetischen Konstitution die Anzahl der transgenen Individuen durch eine Herbizidbehandlung nach dem Auflaufen ermittelt. In der quantitativen PCR dagegen werden Kopienzahlen des transgenen Konstrukts bestimmt und auf die Kopienzahlen eines Referenzgens bezogen. Bei der Bestimmung der Transgenanteile über Genomäquivalente sind, bei gleichem Ergebnis in einem Biotest, Unterschiede zu erwarten, je nach dem ob die transgene Eigenschaft vom Vater oder von der Mutter vererbt wurde und zusätzlich werden Unterschiede zwischen den Pflanzenarten erwartet. Diese Unterschiede konnten im Rahmen dieser Arbeit für Mais nachgewiesen werden. Bei Vererbung der transgenen Eigenschaft über die Mutter sind höhere Transgenanteile gemessen worden als bei der Weitergabe über den Vater. Diese Ergebnisse sollten auch auf andere Getreidearten übertragbar sein, da alle *Poaceen* das triploide Endosperm als Speicherorgan im Samen nutzen. Bei Raps sind diese Unterschiede nur gering wenngleich auch hier die Tendenz ähnlich ist. Bei Rapskörnern ist das triploide Endosperm bis zur Reife fast vollständig zurückgebildet,

die Unterschiede bestehen hier nur zwischen der Unterschiedlichen Herkunft der Samenschale.

Tabelle 4: Transgenanteile der reziproken Kreuzungen von Mais

Gruppe	Probe	Transgenanteil [%]	n	Mittelwert Transgenanteil real-time PCR* [%]	Standardabweichung [%]
1	♀ Monopol x ♂ T-25	26,935	4	53,56	21,42
		46,266			
		66,066			
		74,962			
2	♀ Monopol x ♂ T-25	0,090	3	0,12	0,05
		0,172			
		0,086			
-	pool ♀ Monopol x ♂ T-25	46,385	1	-	-
3	♀ T-25 x ♂ Monopol	69,633	3	96,29	32,36
		86,945			
		132,303			
4	♀ T-25 x ♂ Monopol	0,533	4	1,31	0,61
		1,372			
		2,011			
		1,304			
-	pool ♀ T-25 x ♂ Monopol	37,037	1	-	-

4. Literatur

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K in: Current Protocols in Molecular Biology (New York: Greene Publishing Associates/Wiley Interscience, 1991).

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

Fowler DB, Downey KR (1970) Lipid and Morphological Changes in Developing Rapeseed *Brassica napus*. *Can J Plant Sci* **50**: 233-247

van Hoef AMA, Kok EJ, Kuiper HA, 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.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5'->3' Exonuclease Activity of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7276-7280

Lee LG, Connell CR, Bloch W (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* **21**: 3761-3766

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 Biotechnol Biochem* **62**: 1461–1464.

Simmonds DH (1978) Structure, Composition and Biochemistry of Cereal Grains. In: 'Cereals' 78: Better Nutrition for the Worlds Millions, ed: Y Pomeranz, p 105 American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minn.