

## Leitfaden für die Probenahme und die Untersuchung zum Nachweis gentechnischer Veränderungen in Reis

Dieser Leitfaden wurde in Abstimmung mit der § 64 LFGB Arbeitsgruppe „Entwicklung von Methoden zur Identifizierung von mit Hilfe gentechnischer Verfahren hergestellter Lebensmittel“ des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) sowie dem Arbeitskreis Lebensmittelchemischer Sachverständiger der Länder und des BVL (ALS) verfasst. Er stellt eine Empfehlung dar und soll zur einheitlichen Probenahme und Untersuchung von Reisprodukten bei der Überwachung durch die zuständigen Landesbehörden sowie der Eigenkontrolle der Wirtschaft beitragen.

Aktuelle Befunde von bislang nicht identifizierten gentechnisch veränderten Reislinien in Reisprodukten (Basmati-Reis) aus anderen Ursprungs- bzw. Herkunftsländern als China lassen es erforderlich erscheinen, Minimalanforderungen für die Analyse von Reisproben auf gentechnische Veränderungen zu empfehlen und neu entwickelte Nachweisverfahren allgemein verfügbar zu machen.

Die Kontrolle von Reisprodukten mit Ursprung in China sollte an den Eingangsorten entsprechend der in den Bestimmungen des Durchführungsbeschlusses der Europäischen Kommission vom 22. Dezember 2011 festgelegten Probenahme- und Analyseverfahren durchgeführt werden (2011/884/EU [1]).

### Probenahme

Die Probenahme von Reis für Lebensmittel als Verwendungszweck erfolgt auf der Grundlage eines Durchführungsbeschlusses der Europäischen Kommission [1].

Demnach beträgt der Umfang der Laborprobe 2,5 kg, bei verarbeiteten Lebensmitteln kann jedoch diese Probe auf 500 g verringert werden.

Bei Körnerproben werden aus der gründlich gemischten Laborprobe vier Analysenproben mit jeweils 10.000 Reiskörnern entnommen (entspricht 240 g gemäß [1]). Gegebenenfalls ist das Tausendkorngewicht vor der Entnahme von Analysenproben zu bestimmen. Bei verarbeiteten Erzeugnissen wie Mehl, Teigwaren oder Stärke kann die Anzahl der Analysenproben reduziert werden.

Mit diesem Verfahren ist bei Reiskörnern daher theoretisch eine relative Nachweisgrenze von 0,03% mit einer statistischen Sicherheit von 99% erreichbar.

### Probenvorbereitung und DNA-Extraktion

Die vier Analysenproben werden separat fein vermahlen und im Weiteren getrennt analysiert.

Aus jeder Analysenprobe werden in der Regel zwei DNA-Extrakte gewonnen. Es wird eine Mindesteinwaage von 1 g für die DNA Extraktion empfohlen.

Erfolgreiche DNA-Extraktionen sind mit Verfahren aus den Anhängen der ISO 21571 [2] durchgeführt worden, insbesondere mit der DNA-Extraktion mit dem CTAB-Verfahren (ISO 21571, Anhang A.3.1). Ein weiteres Verfahren, insbesondere validiert für die Extraktion von DNA aus verpackten (homogenisierten) Reisprodukten, wird in der §64 LFGB Methode L 15.06-1 beschrieben [3].

Andere Extraktions- und Reinigungsverfahren (Kit-Systeme) können gegebenenfalls eingesetzt werden, sofern die Vergleichbarkeit gewährleistet ist.

*Hinweis:* Bei der Verminderung der Einwaage bei Reiskörnern ist zu gewährleisten, dass sich eine ausreichende Menge von Partikeln jedes vermahlene Korn in der Analysenprobe befindet. Dies ist nur bei sehr feiner Vermahlung erreichbar.

### PCR-Nachweis

Jeder DNA-Extrakt wird zunächst mit den in Stufe 1 aufgeführten Screening-Methoden (siehe Seite 2) einem PCR-Test auf jedes einzelne gentechnisch veränderte genetische Element unterzogen. Als DNA-Menge im PCR-Test sollten mindestens 100 ng (photometrisch bestimmt) pro PCR-Ansatz eingesetzt werden.

Bei einem angenommenen haploiden Genomgewicht von ca. 0,47 pg [4] für Reis entspricht dies einer Kopienzahl von mindestens 200.000 Kopien einer Einzelkopie-Zielsequenz, die in jedem PCR-Ansatz enthalten sein

sollten. Für PCR-Verfahren, die auf gentechnisch veränderte genetische Elemente oder Konstrukte abzielen und die eine Sensitivität von 20 oder weniger Kopien haben, sollte dem entsprechend eine relative Nachweisgrenze von 0,01% oder größer erreichbar sein.

Für den Nachweis von gentechnischen Veränderungen in Reis werden die folgenden Stufen der Untersuchung unter Anwendung der jeweils genannten real-time PCR Verfahren empfohlen:

## Screening (1. Stufe)

### **Nachweis von P-35S, T-nos und cry1Ab/Ac (Element-spezifisches Screening)**

- Real-time PCR-Verfahren zur Amplifizierung einer DNA-Sequenz des 35S-Promotors (P-35S) aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) [5,6]
- Real-time PCR-Verfahren zur Amplifizierung einer DNA-Sequenz der Terminator-Region des Nopalin-Synthase-Gens (T-nos) aus *Agrobacterium tumefaciens* [6,7]
- Real-time PCR-Verfahren zur Amplifizierung einer DNA-Sequenz des cry1Ab/cry1Ac Gens [8,9,10]. Detaillierte Angaben zu diesem Verfahren sind im **Anhang 1** beschrieben.
- Real-time PCR-Verfahren zur Amplifizierung der Reis-DNA und zur Bestimmung der praktischen Nachweisgrenze. Für diesen Test sind mehrere Verfahren, basierend auf dem Nachweis des *gos9-*, *pld-* oder des *sps*-Gens, verfügbar [3,11,12].

## Konstrukt-spezifischer Nachweis (2. Stufe)

### **Nachweis von P-ubi–cry, P35S–hpt (175bp) und cry1Ac–T-nos**

- Real-time PCR Verfahren zur Amplifizierung einer DNA-Sequenz aus der Übergangsregion eines Konstrukts bestehend aus dem Ubiquitin Promotor (*P-ubi*) aus Mais (*Zea mays*) und dem Bt-Toxin cry1Ab/cry1Ac Gen aus *Bacillus thuringiensis* [13]
- Real-time PCR Verfahren zur Amplifizierung einer DNA-Sequenz des Überganges des 35S-Promotors aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) in eine Sequenz des Hygromycin-Resistenzgens (*hpt*) aus *Escherichia coli*. [14]. Detaillierte Angaben zu diesem Verfahren sind im **Anhang 2** beschrieben.  
*Anmerkung: Um ein breites Spektrum von P35S-hpt Konstrukten zu erfassen, amplifiziert dieses Verfahren einen größeren Sequenzbereich als die in [13] beschriebene 35S-hpt (90bp) Methode.*
- Real-time PCR Verfahren zur Amplifizierung einer DNA-Sequenz aus der Übergangsregion eines Konstrukts bestehend aus dem Bt-Toxin *cry1Ac* Gen aus *Bacillus thuringiensis* und der Terminator-Region des Nopalin-Synthase-Gens (T-nos) aus *Agrobacterium tumefaciens* nach Akiyama et al. [15]. Detaillierte Angaben zu diesem Verfahren sind im **Anhang 3** beschrieben.
- Real-time PCR Verfahren zur Amplifizierung einer für Bt63 (TT51-1) spezifischen DNA-Sequenz aus der Übergangsregion eines Konstrukts bestehend aus dem Bt-Toxin *cry1A(c)* Gen aus *Bacillus thuringiensis* und der Terminator-Region des Nopalin-Synthase-Gens (T-nos) aus *Agrobacterium tumefaciens* [3]

## Event-spezifischer Nachweis (3. Stufe, optional)

- Real-time PCR basierter event-spezifischer Nachweis von Bt63 (TT51-1) [16]
- Real-time PCR basierter event-spezifischer Nachweis von Kefeng6 Reis [17]
- Real-time PCR basierter event-spezifischer Nachweis von Kefeng8 Reis [9]
- Real-time PCR basierter event-spezifischer Nachweis von KMD1 Reis [18]

## Nachweis von DNA weiterer Zielspezies

Zum Nachweis von Mais-, Soja- und Baumwoll-DNA in Proben-DNA Extrakten, die in Stufe 1 und Stufe 2 positive PCR-Ergebnisse zeigten, kann der Referenzgen-Nachweis des *hmg-*, *lectin-* bzw. *sah7*-Gens eingesetzt werden [19, 20, 21].

## Auswertung der PCR-Ergebnisse

Alle Negativ- und Positivkontrollen müssen das erwartete Ergebnis aufweisen (siehe ISO 24276 [22]).

Im Falle eines positiven Screening-Ergebnisses (Stufe 1) werden die PCR-positiven Proben-DNA Extrakte im nächsten Schritt mit konstrukt-spezifischen PCR-Verfahren weiter analysiert (Stufe 2). Ein positives Ergebnis aus Stufe 2 kann gegebenenfalls in Stufe 3 spezifiziert werden (optional).

Wird für mindestens eine der Analysenproben die jeweilige Zielsequenz nachgewiesen, so gilt dieses Ergebnis für die gesamte Probe.

Bei positiven Befunden sollte gezeigt werden, dass in den Überprüfungen auf amplifizierbare DNA die relevanten Pflanzenspezies wie Mais, Soja oder Baumwolle und gegebenenfalls der Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) [23] ausgeschlossen werden können.

*Anmerkung: Wurden alle Kontrollen bezüglich anderer Zielspezies als Reis durchgeführt und sind diese negativ, kann auch bei positiven Ergebnissen aus Stufe 1 davon ausgegangen werden, dass gentechnisch verändertes Reismaterial in der Probe anwesend ist.*

Zur Auswertung der PCR-Ergebnisse kann die im **Anhang 4** dargestellte Screening-Tabelle für gentechnisch veränderte Reislinien herangezogen werden, in der alle bisher vorliegenden experimentellen und theoretischen Verifizierungen für die angegebenen Nachweisverfahren dargestellt sind.

## Anhang 1

**Real-time PCR zum Element-spezifischen Nachweis von cry1Ab/cry1Ac DNA-Sequenzen****Sensitivität:** <20 Kopien (in-house Validierung)**Spezifität:**

Nachweis	experimentell verifiziert	theoretisch verifiziert (GenBank Nr.)
positiv	Reis: Bt63, KeFeng6, KMD1 Mais: Bt11 Soja: MON87701 Baumwolle: MON531, MON15985	Reis: Bt-ZJ22 (HQ154128) Baumwolle: GK-12 (GU583854), Xinmian-33B (GU583853), Lumianyan-15(GU583855) Aubergine: Event EE-1 (DM460255)
negativ	Mais: MON810, MIR604, CBH-351, DAS 59122, MON863, TC1507, MON88017, MON 89034 Baumwolle: 281-24-236 x 3006-210-23	

**Amplikonlänge:** 74 bp**Amplikonsequenz:**5' - GAGGAAATGCGTATTCAATTCAACnACATGAACAGCGCCTTGACCACAGCnnnnCCATTGTTTCGCAGTCCAGAA - 3'

Tabelle 1 — Oligonukleotide

Name	DNA Sequenz des Oligonukleotids	Endkonzentration in der PCR
cry1Ab / cry1Ac als Zielsequenz [7,8,9]		
Bt-F1(mod)	5'-gAg gAA ATg CgT ATT CAA TTC AAC -3'	400 nmol/l
Bt-R	5'- TTC Tgg ACT gCg AAC AAT gg -3'	400 nmol/l
Bt-P	5'-FAM- ACA TgA ACA gCg CCT TgA CCA CAg C-TAMRA-3' <sup>a</sup>	100 nmol/l
<sup>a</sup> andere Fluoreszenzfarbstoffe oder Quencher können verwendet werden, sofern sie vergleichbare Ergebnisse zeigen		

Tabelle 2 — Reaktionsansatz

Gesamtvolumen der Reaktion	25 µl
Proben DNA (bis zu 200 ng) oder Kontroll-DNA	5 µl
PCR Pufferlösung <sup>1</sup> (enthält MgCl <sub>2</sub> , dNTP's und hot-start DNA Polymerase)	12,5 µl
Primer Bt-F1(mod) und Bt-R	siehe Tabelle 1
Sonde Bt-P	siehe Tabelle 1
Wasser	auf 25 µl auffüllen

<sup>1</sup> Taqman Universal Mastermix; wenn andere Mastermix-Reagenzien verwendet werden, muss gegebenenfalls das Temperatur-Zeit-Programm entsprechend angepasst werden.

Tabelle 3 — Temperatur-Zeit-Programm<sup>1</sup>

Stufe	Parameter	Temperatur	Zeit	Fluoreszenz-messung	Zyklen	
1	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	nein	1	
2	Amplifikation	Denaturierung	95 °C	15 s	nein	45
		Annealing und Elongation	60 °C	60 s	ja	

**Anmerkung:**

Um eine größere Übereinstimmung des Primers Bt-F1(mod) mit bekannten cry1Ab/cry1Ac DNA Sequenzen zu erreichen, ist dieser Primer optimiert. Es unterscheiden sich die ersten 2 Basen des Primers Bt-F1(mod) von der in [9] und [10] beschriebenen Sequenz.

## Anhang 2

### Real-time PCR zum Konstrukt-spezifischen Nachweis von P35S – hpt (175bp) DNA-Sequenzen

**Sensitivität:** <20 Kopien (in-house Validierung)

**Spezifität:**

Nachweis	experimentell verifiziert	theoretisch verifiziert (GenBank Nr.)
positiv	Reis: KeFeng6, KMD1, unbekannte Events in Basmati-Reis (RASFF 2011.1646, 2012.0252)	99% Übereinstimmung mit binären Pflanzentransformationsvektoren, die 35S-hpt enthalten
negativ	Mais: Bt11, Mon810, NK603, TC1507 Reis: Bt63, LL601 Soja: 40-3-2, A2704-12, A5547-127 Baumwolle: MON15985 Papaya: Sunup-Papaya	Reis: KeFeng8, LL62, LL601, Bt-ZJ22 (HQ154128)

**Amplikonlänge:** 175 bp (in KeFeng6); 139bp in KMD1; 135bp in gv-Basmati

**Amplikonsequenz in Kefeng6:**

5' – GACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGA  
GGACACGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCGAGCTTTCGCAGATCCGGGGGGCAATGAGATATGAA  
AAAGCCTGAACTCA – 3'

**Tabelle 1 — Oligonukleotide**

Name	DNA Sequenz des Oligonukleotids	Endkonzentration in der PCR
P-35S – hpt als Zielsequenz [14]		
35S-F [24]	5'- gAC gTA Agg gAT gAC gCA CAA -3'	400 nmol/l
652-R (hpt166-R)	5'- TgA gTT CAg gCT TTT TCA TAT CTC AT -3'	400 nmol/l
35S-T [24]	5'-FAM-CCC ACT ATC CTT CgC AAg ACC CTT CC-TAMRA-3' <sup>a</sup>	100 nmol/l
<sup>a</sup> andere Fluoreszenzfarbstoffe oder Quencher können verwendet werden, sofern sie vergleichbare Ergebnisse zeigen		

**Tabelle 2 — Reaktionsansatz**

Gesamtvolumen der Reaktion	25 µl
Proben DNA (bis zu 200 ng) oder Kontroll-DNA	5 µl
PCR Pufferlösung <sup>1</sup> (enthält MgCl <sub>2</sub> , dNTP's und hot-start DNA Polymerase)	12,5 µl
Primer 307-F_35S-F und 652-R (hpt166-R)	siehe Tabelle 1
Sonde 307-Tm_35S-T	siehe Tabelle 1
Wasser	auf 25 µl auffüllen

<sup>1</sup> Taqman Universal Mastermix; wenn andere Mastermix-Reagenzien verwendet werden, muss gegebenenfalls das Temperatur-Zeit-Programm entsprechend angepasst werden.

**Tabelle 3 — Temperatur-Zeit-Programm<sup>1</sup>**

Stufe	Parameter	Temperatur	Zeit	Fluoreszenz-messung	Zyklen	
1	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	nein	1	
2	Amplifikation	Denaturierung	95 °C	15 s	nein	45
		Annealing und Elongation	60 °C	60 s	ja	

**Anmerkung:**

Um ein breites Spektrum von P-35S-hpt Konstrukten zu erfassen, amplifiziert dieses Verfahren einen größeren Sequenzbereich als die in [13] beschriebene 35S-hpt (90bp) Methode.

## Anhang 3

**Real-time PCR zum Konstrukt-spezifischen Nachweis von cry1Ab/Ac- T-nos DNA-Sequenzen (KeFeng-ähnliche Reislinien)**

Sensitivität: &lt;20 Kopien (in-house Validierung)

Spezifität:

Nachweis	experimentell verifiziert	theoretisch verifiziert (GenBank Nr.)
positiv	Reis: KeFeng6, unbekannte Events in Basmati-Reis (RASFF 2011.1646, 2012.0252)	
negativ	Reis: Bt63, KMD1, LL62 Mais: Bt11	Reis: Bt-ZJ22 (HQ154128) Mais: Bt176

Amplikonlänge: 142 bp

Amplikonsequenz in Kefeng6:

5' - GCAGGAGTGATTATCGACAGATTCGAGTTCATTCCAGTTACTGCAACACTCGAGGCTGAATGAGAATTCGGTACCCCGA  
CCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTT - 3'

Tabelle 1 — Oligonukleotide

Name	DNA Sequenz des Oligonukleotids	Endkonzentration in der PCR
cry1Ab/Ac – T-nos als Zielsequenz [15]		
T51-SF-2	5'- gCA ggA gTg ATT ATC gAC AgA TTC -3'	750 nmol/l
OsNOS-R2	5'- AAg ACC ggC AAC Agg ATT CA -3'	750 nmol/l
NGMr-Taq	5'-FAM- AAT gAg AAT TCg gTA CCC CgA CCT gCA -BBQ-3' <sup>a</sup>	150 nmol/l
<sup>a</sup> andere Fluoreszenzfarbstoffe oder Quencher können verwendet werden, sofern sie vergleichbare Ergebnisse zeigen		

Tabelle 2 — Reaktionsansatz

Gesamtvolumen der Reaktion	25 µl
Proben DNA (bis zu 200 ng) oder Kontroll-DNA	5 µl
PCR Pufferlösung <sup>1</sup> (enthält MgCl <sub>2</sub> , dNTP's und hot-start DNA Polymerase)	12,5 µl
Primer T51-SF-2 und OsNOS-R2	siehe Tabelle 1
Sonde NGMr-Taq	siehe Tabelle 1
Wasser	auf 25 µl auffüllen

<sup>1</sup> Taqman Universal Mastermix; wenn andere Mastermix-Reagenzien verwendet werden, muss gegebenenfalls das Temperatur-Zeit-Programm entsprechend angepasst werden.

Tabelle 3 — Temperatur-Zeit-Programm<sup>1</sup>

Stufe	Parameter	Temperatur	Zeit	Fluoreszenz-messung	Zyklen	
1	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	nein	1	
2	Amplifikation	Denaturierung	95 °C	20 s	nein	45
		Annealing und Elongation	60 °C	60 s	ja	

Anmerkung:

Um eine größere Übereinstimmung des Primers T51-SF-2 mit bekannten DNA Sequenzen zu erreichen (vgl. GenBank Nr. HQ161057 = Kefeng6), wurde dieser Primer optimiert. Deshalb unterscheiden sich die letzten vier Basen des Primers T51-SF-2 von der in [15] beschriebenen Sequenz.

## Anhang 4

## Screening-Tabelle gentechnisch veränderter Reislinien (Stand 06.03.2012)

Event	Herkunft	P-35S [5, 6]	T-nos [6, 7]	cry1Ab/ cry1Ac [8]	35S-bar [25]	P-ubi- cry1A(b) [13]	35S-hpt (90bp) [13]	P35S-hpt (175bp) [14]	cpti-Tnos [13]	cryIA(c)- Tnos [3]	cry1Ab/Ac- Tnos [15]
Bt63	China	N	P	P	-	N	N	N	N	P	N
Bt-ZJ22	China	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
KeFeng 6	China	P	P	P	-	P	P	P	P	N	P
KeFeng 8	China	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
KMD1	China	P	P	P	-	P	N	P	N	N	N
LL62	USA	P	N	N	P	-	-	-	-	-	-
LL601	USA	P	N	N	P	-	-	-	-	-	-
LL604	USA	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
gv-Basmati	unbekannt	P	P	P	-	P	N	P	N	N	P

## Legende

P = Positiv, experimentell verifiziert  
N = Negativ, experimentell verifiziert  
- = theoretisch negativ  
+ = theoretisch positiv

## Literatur

- [1] Durchführungsbeschluss der Kommission vom 22. Dezember 2011 über Sofortmaßnahmen hinsichtlich nicht zugelassenem genetisch verändertem Reis in Reiserzeugnissen mit Ursprung in China und zur Aufhebung der Entscheidung 2008/289/EG (2011/884/EU)
- [2] DIN EN ISO 21571:2005, Lebensmittel – Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten – Nukleinsäureextraktion. Anhang A.3.1
- [3] Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Band I (L), L 15.06-1: Nachweis einer gentechnisch veränderten DNA-Sequenz in Reisprodukten – cryIA(c)-Tnos konstrukt-spezifisches Verfahren. Dezember 2008
- [4] Arumuganathan K., Earle E.D. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9: 208-218.
- [5] DIN EN ISO 21570: 2005 Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Quantitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren. Anhang B1.
- [6] Waiblinger H.-U., Grohmann L., Mankertz J., Engelbert D., Pietsch K. (2008) Validation and collaborative study of a P35S and T-nos duplex real-time screening method to detect genetically modified organisms in food products. *Eur. Food Res. and Technol.* 226: 1221-1228 (entspricht Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Band I (L), L 00.00-122)
- [7] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Band I (L), L 00.00-116: Nachweis einer bestimmten, häufig in gentechnisch veränderten Organismen (GVO) verwendeten DNA-Sequenz aus *Agrobacterium tumefaciens* (T-nos) in Lebensmitteln - Screening-Verfahren. Dezember 2007
- [8] Nachweis einer bestimmten, häufig in gentechnisch veränderten Organismen (GVO) verwendeten DNA-Sequenz aus *Bacillus thuringiensis* (cryIAb/cryIAc) in Lebensmitteln - Screening-Verfahren 2012) in Vorbereitung (siehe Anhang 1)
- [9] Wang W., Zhu T., Lai F., Fu Q. (2012) Event-specific qualitative and quantitative detection of transgenic rice Kefeng-8 by characterization of the transgene flanking sequence. *Eur. Food Res. Technol.* DOI: 10.1007/s00217-011-1654-y
- [10] Detection of genetically modified plants and their derived products — Qualitative PCR methods for *Bt* rice to control insect pests. Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, Bulletin 953-6-2007 <http://www.stee.agri.gov.cn/biosafety/wnlj/P020080214405619156076.doc>
- [11] Mazzara M., Cordeil S., Van den Eede G. (2006): Event-specific Method for the Quantification of Rice Line LLRICE62 Using Real-time PCR. [http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/LLRICE62\\_validated\\_Protocol.pdf](http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/LLRICE62_validated_Protocol.pdf)
- [12] Jiang L., Yang L., Zhang H., Guo J., Mazzara M., van den Eede G. (2009) International Collaborative Study of the Endogenous Reference Gene, Sucrose Phosphate Synthase (SPS), Used for Qualitative and Quantitative Analysis of Genetically Modified Rice. *J. Agric. Food Chem.* 57: 3525-3532
- [13] Reiting R., Grohmann L., Mäde D. (2010) A testing cascade for the detection of genetically modified rice by real-time PCR in food and its application for detection of an unauthorized rice line similar to KeFeng6. *J. Verbr. Lebensm.* 5: 185–188
- [14] Reiting R., Grohmann L., Mäde D. (2012) Publikation in Vorbereitung
- [15] Akiyama H., Sasaki N., Sakata K., Ohmori K., Toyota A., Kikuchi Y., Watanabe T., Furui S., Kitta K., Maitani T. (2007) Indicated detection of two unapproved transgenic rice lines contaminating vermicelli products. *J. Agric. Food Chem.* 55: 5942-5947
- [16] Wu G., Wu Y. H., Nie S. J., Zhang L., Xiao L., Cao Y. L. (2010) Real-time PCR method for detection of the transgenic rice event TT51-1. *Food Chem.* 119: 417–422
- [17] Su C., Xie J., Wang X., Peng Y. (2011) Integrated structure and event-specific real-time detection of transgenic cry1Ac/SCK rice Kefeng 6. *Eur. Food Res. Technol.* 232: 351–359
- [18] Babekova R., Funk T., Pecoraro S., Engel K.-H., Busch U. (2009) Development of an event-specific real-time PCR detection method for the transgenic Bt rice line KMD1. *Eur. Food Res. Technol.* 228: 707–716
- [19] DIN EN ISO 21570:2005 Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Quantitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren. Anhang D2.



- [20] DIN EN ISO 21570:2005 Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Quantitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren. Anhang C2.
- [21] M. Mazzara, S. Larcher, C. Savini, C. Charles-Delobel, G. Van Den Eede (2006) Event-Specific Methods for the Quantitation of the Hybrid Cotton Line 281-24-236/3006-210-23 Using Real-Time PCR.  
[http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/281-24-36\\_cotton\\_Protocol.pdf](http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/281-24-36_cotton_Protocol.pdf)
- [22] DIN EN ISO 24576:2006 Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Allgemeine Anforderungen und Definitionen
- [23] Chaouachi M., Fortabat M.N., Geldreich A., Yot P., Kerlan C., Kebdani N., Audeon C., Romaniuk M., Bertheau Y. (2008) An accurate real-time PCR test for the detection and quantification of cauliflower mosaic virus (CaMV) applicable in GMO screening. *Eur. Food. Res. Technol.* 227: 789-798
- [24] Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Band I (L) L29.00-9: Qualitativer Nachweis modifizierter DNA-Sequenzen in Papaya-Ring-Spot-Virus-resistenter Papaya (*Carica papaya*) — Konstrukt-spezifisches Verfahren - Anhang
- [25] Verification of the Bayer CropScience 35S-BAR method for the detection of LL62/LL601 rice using Real-Time PCR, produced by the US Department of Agriculture (28.08.2006)  
<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/35SBarRiceVerificationReportrev.pdf>