

食品中转基因成分检测

第 7 章

Roundup Ready®大豆、MON810 玉米和 Bt-176 玉米的特性

M.Querci, M.Mazzara



目 录

第 7 章

Roundup Ready®大豆、MON810 玉米和 Bt-176 玉米的特性

Roundup Ready®大豆的特性	3
MON810 玉米的特性	7
Bt-176 玉米的特性	11
参考文献	16

Roundup Ready®大豆的特性

简要说明

命名	GTS 40-3-2
申请者	加拿大孟山都公司 (Monsanto Canada Inc.)
植物物种	<i>Glycine max</i> L. (大豆)
新特性	对除草剂Roundup®的有效成分—草甘膦的抗性
特性导入方法	粒子加速器 (基因枪法)
建议用途	生产动物饲料 (大部分是脱脂烤粉或豆粕), 作为食品 (主要是油、蛋白质和食用纤维)

背景信息

大豆品系 GTS 40-3-2 是由加拿大孟山都公司 (Monsanto) 开发的, 它使得在大豆种植中, 可以选用草甘膦作除草剂。GTS 40-3-2 的发展是以 DNA 重组技术为基础, 引入抗草甘膦的 5-烯醇式丙酮莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSPS) 基因, 该基因是从 *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4 分离出来的, 转入商业大豆品种 “A5403” 中 (ASgrow 种子公司)。

新特征的描述

草甘膦抗性

Roundup®的有效成分草甘膦作为一种非选择性除草工具, 是世界范围内被广泛应用的除草剂。草甘膦是 5-烯醇式丙酮莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSPS) 基因的竞争性抑制剂, 该酶在合成芳香族氨基酸苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸的中间物莽草酸生化途径中发挥重要作用 (图 1), 草甘膦能抑制 EPSPS, 从而抑制植物生长, 甚至死亡。

插入的抗草甘膦基因编码一种重要酶的细菌变种 (来自 *Agrobacterium tumefaciens* 菌株 CP4), 这种酶广泛存在于植物、真菌和微生物中, 对草甘膦不敏感, 所以可以完成植物所需的芳香族氨基酸的新陈代谢。

EPSPS 基因受来自花椰菜花叶病毒 (**P-CaMV E35S**) 的组成型强启动子和来自 *Agrobacterium tumefaciens* 的胭脂碱合酶终止子 (**T-nos**) 的调控 (图 2), 一段编码叶绿体转运肽 (**CTP4**, 来自 *Petunia hybrida*) 的植物 DNA 序列克隆到抗草甘膦基因的 5'端, 此信号肽与 EPSPS 基因融合, 以便将新合成的酶转运到叶绿体中, 因为莽草酸生化途径发生在叶绿体, 并且草甘膦的作用位点也在叶绿体, 所以一旦转运完成, 转运肽就被剪切掉, 并很快被一种特异性蛋白酶降解。

EPSP 合酶在自然界广泛存在, 没有预期毒性和致敏性。并且与序列数据库中的有毒性和致敏性多肽序列比对后发现, 该酶的氨基酸序列与任何已知的毒素和致敏原都没有明显的同源性。

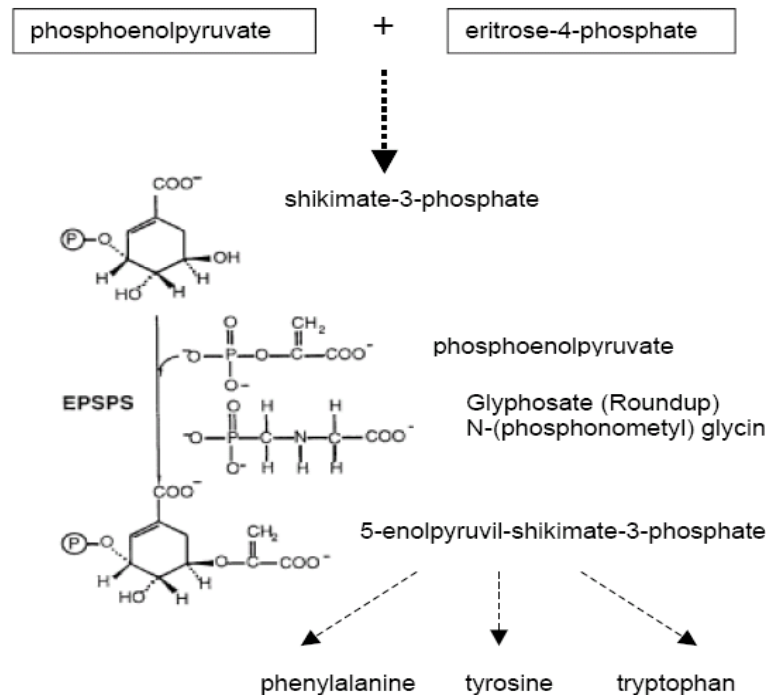


图 1. EPSPS 催化莽草酸-3-磷酸与磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 生成 5-烯醇式丙酮莽草酸 3-磷酸 (EPSP) 和磷酸的反应。EPSPS 是合成芳香族氨基酸的中间产物。这个生化途径被抑制, 蛋白质合成中断, 会引起植物死亡。EPSPS 是草甘膦在植物体内的唯一生理作用位点, 而其它利用 PEP 的酶都不受草甘膦的抑制。

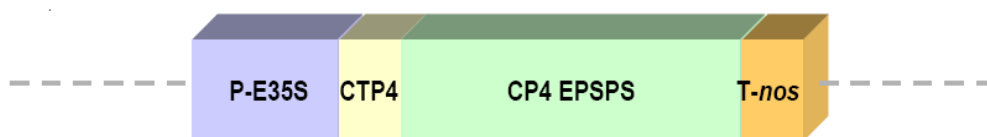


图 2. Roundup Ready®大豆基因盒示意图 (改自 Padgett et al.1995)

研制方法

商业大豆品种 A5403 (ASgrow 种子公司) 是用粒子轰击的方法转化来自 *Escherichia coli* 的 PV-GMGT04 质粒载体(见图 3)。PV-GMGT04 质粒含有编码抗草甘膦的 *CP4 EPSPS* 基因, 可以产生 β -葡萄糖苷酸酶作为选择性标记的 *gus* 基因, 还有产生抗生素(卡那霉素)抗性的 *nptII* 基因。原始的筛选转化株显示两个整合位点, 一个有 *gus* 标记的选择性位点, 另一个是包含草甘膦抗性基因位点。在后来的有性生殖过程中, 这两个位点独立分开, 所以 GTS40-3-2, 只含有一个插入位点, 即草甘膦抗性基因整合的位点。

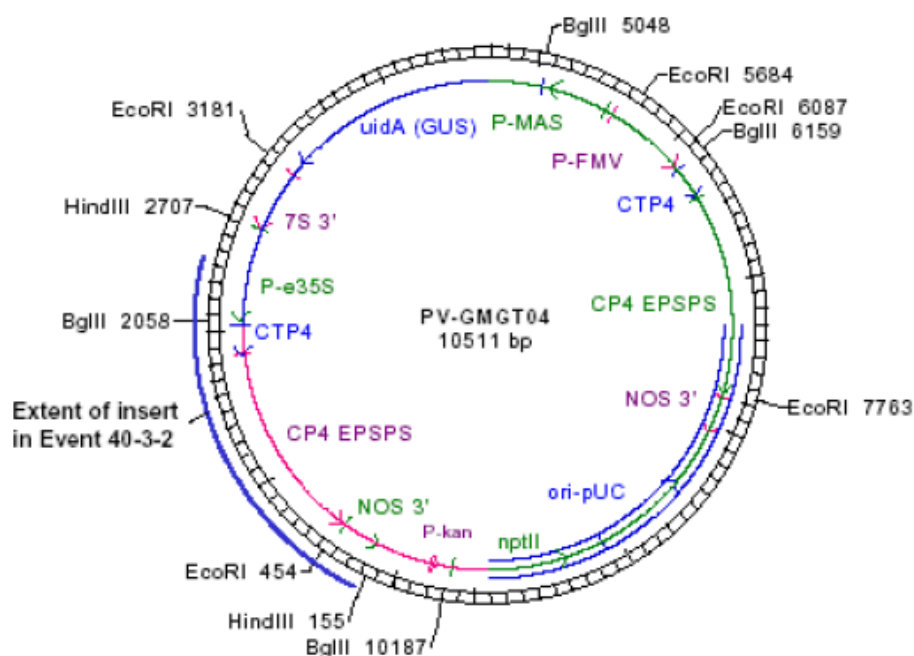


图3. 含有RR大豆品种40-3-2转化中所用的载体PV-GMGT04的遗传要素的质粒图。
(选自 Monsanto, 2000)

遗传稳定性

原始数据 (Padgett et al., 1995, 1996) 显示 GTS 40-3-2 含有单个功能性 *CP4 EPSPS* 基因框, 该基因框包括花椰菜花叶病毒 (CaMV) E35S 启动子, 叶绿体转运肽, *CP4 EPSPS* 编码序列, 和 *nos* 多聚腺苷酸化信号。

原始质粒载体中没有发现插入除融合基因之外的任何编码区。对其后代的观察显示, 上述的融合基因没有发生分离, 说明品种 GTS 40-3-2 的融合基因是纯合的。超过六代的 DNA 分析显示插入的基因是稳定的。

最近的表型研究表明，在插入的 DNA 的整合过程中，发生了几次重组，而且除了最初的功能性插入，Roundup Ready®大豆品种 40-3-2 包含了插入 DNA 的两个分别为 250 和 72 bp 的非功能片段，(Monsanto, 2000; Windels et al.,2001)。

管理决议

Roundup Ready®大豆是目前在欧盟唯一市场化的转基因大豆品种。1994 年在美国得到许可之后，1996 年 4 月 3 日，欧盟法令 96/281/EC (Commision Decision96/281/EC) 允许该转基因大豆的进口。虽然这个决议允许欧盟国家进口这种转基因大豆种子，但只允许该转基因大豆种子用于工业产业，加工成为无生命产品，如动物饲料，食品和其它大豆生产的产品。

MON810 玉米的特性

简要说明

命名	MON810玉米品系 (商品名: YieldGard®)
申请者	加拿大孟山都公司 (Monsanto Canada Inc.)
植物物种	<i>Zea mays</i> L. (玉米)
新特性	对欧洲玉米螟 (<i>Ostrinia nubilalis</i>) 的抗性
特性导入方法	粒子加速器 (基因枪法)
建议用途	用于食品 (湿、干、碾磨或种子油), 食用和家畜的饲料。

背景信息

MON810 玉米 (YieldGard®) 是由加拿大孟山都公司开发的一种转基因玉米, 该玉米能对欧洲玉米螟(ECB;*Ostrinia nubilalis*)有特殊抗性。针对欧洲玉米螟 ECB 在幼虫阶段啃食玉米的现象, 该转基因玉米提供了一种减少常规杀虫剂的使用, 并能控制虫害, 减少作物产量损失的方法。

MON810研发是以DNA重组技术和植物细胞的微注射轰击为基础, 并引入一个编码自然发生的抗虫蛋白基因 (源自*Bacillus thuringiensis* ssp. *Kurstaki*)。该抗虫蛋白对鳞翅目的某些物种有活性, 还有蝴蝶和蛾所属的昆虫目, 也包括ECB。更特别的是, MON810中表达的蛋白是抗虫蛋白的截短形式, CRYIA(b) δ -内毒素, 该蛋白的截断形式能保护玉米免受欧洲玉米螟ECB幼虫对茎叶的损害。

新特性的描述

对欧洲玉米螟 (European Corn Borer) 抗性

Bacillus thuringiensis ssp. *Kurstaki* 是一种可形成内生孢子、革兰氏阳性、生于土壤的细菌。在产生孢子阶段, 除了内生孢子, 它还产生几种抗虫蛋白晶体, 包括 δ -内毒素 CRYIA(b)蛋白, 它能对某些鳞翅目昆虫如欧洲玉米螟(ECB)、云杉蚜虫、天幕毛虫、舞毒

蛾、小菜蛾、粉纹夜蛾、烟草蚜虫、缘点纹白蝶发挥作用。该蛋白多次被证实对人类、其他脊椎动物和益虫没有毒性 (Lee *et al.*, 1995)。

MON810 被转化了受组成型强启动子 CaMV E35S 和玉米 HSP70 内含子前导序列调控的 *cryIA (b)* 基因的一个拷贝。

来自 *Bacillus thuringiensis* ssp. *Kurstaki HD-1* 的 *cryIA (b)* 编码序列经修饰后可大量地表达植物中的 δ -内毒素 CRYIA(b)蛋白，该蛋白被切成一个有生物活性的、抗胰岛素的核糖体后能对鳞翅目的幼虫产生毒性。一般认为蛋白的活性部分与易感昆虫的中肠上皮细胞上的特殊受体结合，之后形成小孔，破坏了渗透平衡，最终导致细胞破裂，从而使植物产生抗虫活性。玉米鳞翅目害虫--欧洲玉米螟 ECB 和玉米耳虫都对该蛋白敏感。

转基因玉米表达的毒素的氨基酸序列与自然环境下的蛋白序列的一致，且与有机食品工厂广泛应用的作为生物杀虫剂的蛋白的序列相同。



图 4. 在 MON810 转化中所用的质粒 PV-ZMBK07 构造的 *cryIA(b)* 示意图，包括强启动子 CaMV 35S、玉米 hsp70 内含子 1、合成的 δ -内毒素 *cryIA(b)* 基因和之后的 *nos* 终止子 (修改自 BATS, 2003)。

研制方法

用质粒 DNAs, PV-ZMBK07 和 PV-ZMGT10 的混合物生物转化基因型为 Hi-II 的玉米得到 MON810。PV-ZMBK07 质粒含有 *cryIA(b)* 基因 (图 5)，PV-ZMGT10 含有 *CP4 EPSPS* 和 *gox* 基因。两个质粒中都含有受一个细菌启动子调控的 *nptII* 基因 (用于细菌筛选)，和来自 pUC 质粒 (ori-pUC) 的复制起点，以满足在 *Escherichia coli* 中质粒复制的要求。这两种载体用微注射轰击的方法引入到培养的植物细胞中。筛选成功转化草甘膦抗性的细胞，随后在组织培养基上培养繁殖 (Armstrong *et al.*, 1991)。

作者提供的分子分析显示，只有 PV-ZMBK07 的元素整合到 MON810 中，包括强启动子 CaMV35S (E35S)，玉米 hsp70 内含子 1 和截短的 *cryIA(b)* 基因。PV-ZMBK07 中的 *nos* 3'终止信号在基因框的 3'端截短时丢失，因此没有整合到宿主基因组中 (BATS, 2003)。

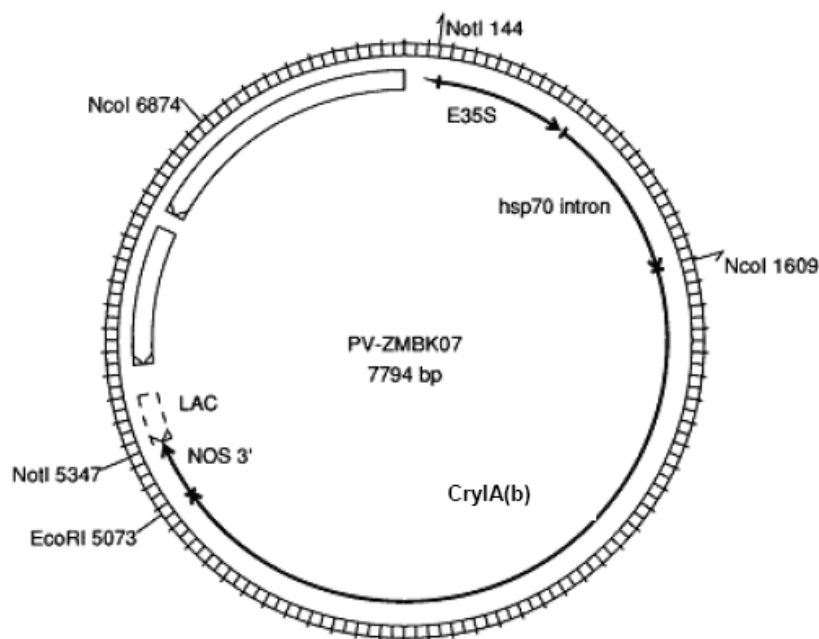


图 5. 用于 MON810 转化的质粒 PV-ZMBK07 示意图。(选自 Essential Biosafety 的 Agbios Database)

遗传稳定性

作者提供的数据显示，分离和稳定性与 *cryIA(b)* 基因单位点插入 MON810 基因组一致。通过几代的杂交证明了插入的稳定性。该玉米品种与几种不同基因型的玉米杂交四代之后，仍然保留抗欧洲玉米螟 ECB 的性质。第三代回交后获得 MON810。通过对三代的 Southern Blot 分析也证明了单个插入位点的整合稳定性。

管理决议

1996 年 7 月，美国环境保护局批准了玉米品系 MON810 的种植。在 1998 年 4 月 22 日的欧盟法令 98/294/EC 被批准该玉米品系的商业化 (Commission Decision 98/294/EC)。

加拿大食品检查局通过了决议文件 97-19，允许它作为食物和饲料。阿根廷、澳大利亚、日本、南非和瑞士也允许种植玉米品系 MON810。

该品系玉米将作为食品使用 (湿磨、干磨或种子油)、食用或者作青贮饲料。

Bt-176 玉米的特性

简要说明

命名	Bt-176玉米品系 (商品名YieldGard®)
申请者	Ciba Seeds of Ciba-Geigy 和 Mycogen Corporation
植物物种	<i>Zea mays</i> L. (玉米)
新特性	抗欧洲玉米螟 (<i>Ostrinia nubilalis</i>); 抗草胺磷除草剂
特性导入方法	对未成熟胚胎使用粒子加速器 (基因枪法)
建议用途	培育杂交玉米

背景信息

Ciba Seeds and Mycogen Corporation 开发了一种对欧洲玉米螟 (ECB)有抗性的玉米。这个玉米品系, 命名为 Bt-176, 用 DNA 重组技术和胚胎的微注射轰击转化, 生产一种抗虫蛋白, 该蛋白来自 *Bacillus thuringiensis* ssp. *Kurstaki*, 对鳞翅目的某些物种有活性, 还有蝴蝶和蛾所属的昆虫目, 也包括 ECB。特别的是, 该蛋白是抗虫蛋白的截短形式, CRYIA(b) δ -内毒素, 保护玉米免受欧洲玉米螟 ECB 幼虫的损害。此外, 该品系玉米被与除草剂草胺磷耐性有关另一种基因共转化, 该抗除草剂基因可以用来在发展的早期选择转化的植株。

新特征的描述

对欧洲玉米螟 (European Corn Borer) 抗性

Bacillus thuringiensis ssp. *Kurstaki* 是一种可形成内生孢子、革兰氏阳性、生于土壤的细菌。在产生孢子阶段, 除了内生孢子, 它还产生几种抗虫蛋白晶体, 包括 δ -内毒素 CRYIA(b)蛋白, 它对某些鳞翅目昆虫有活性, 如欧洲玉米螟 (ECB)、云杉蚜虫、天幕毛虫、舞毒蛾、小菜蛾、粉纹夜蛾、烟草蚜虫和缘点纹白蝶。该蛋白多次被证实对人类、其他脊椎动物和益虫没有毒性 (Lee *et al.*, 1995)。

来自 *Bacillus thuringiensis* ssp. *Kurstaki HD-1* 的合成 *cryIA (b)* 基因，编码 δ -内毒素 CRYIA(b)的截短形式，并被修饰以增强在玉米中的表达。该合成基因与原来的基因在核酸水平约有 65%同源性 (Koziel *et al.*, 1993)。该截短 CRYIA(b)蛋白包含原 CRYIA(b)的杀虫区域。该蛋白的活性部分与易感昆虫的中肠上皮细胞上的特殊受体结合，之后形成小孔，破坏了渗透平衡，最终导致细胞破裂，从而具有抗虫活性。

玉米 Bt-176 用两个合成的 *cryIA (b)* 基因构造体转化而来。一个构造体在玉米磷酸烯醇式丙酮酸-羧化酶启动子 (P-PEPC) 的调控下，在绿色组织中表达。另一个构造体在玉米钙依赖的蛋白激酶启动子 (P-CDPK) 调控下，专门在花粉中表达。花椰菜花叶病毒的终止子 (T-CaMV 35S) 调控两个构造体的转录终止，并且该两个构造体含有玉米磷酸烯醇式丙酮酸-羧化酶基因的内含子 9 (见图 6 和 7)。

在绿色组织中表达 CRYIA(b)蛋白使植物具有对第一代啃食叶片的欧洲玉米螟 ECB 幼虫抗性。在花粉中的表达则使植物获得抗食用花粉的第二代 ECB 幼虫的能力。在模拟哺乳动物胃的条件下，体外消化 Bt176 玉米叶子中的 CRYIA(b)蛋白的研究表明，该蛋白与常规食用蛋白的降解方式一样。

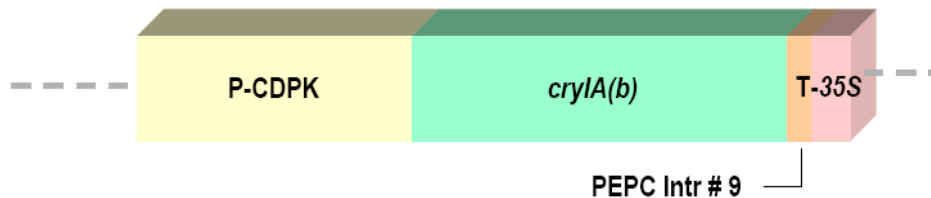


图 6. 受 CDPK 启动子调控的合成 *cryIA (b)* 基因示意图 (转自 Matsuoka *et al.*, 2000)

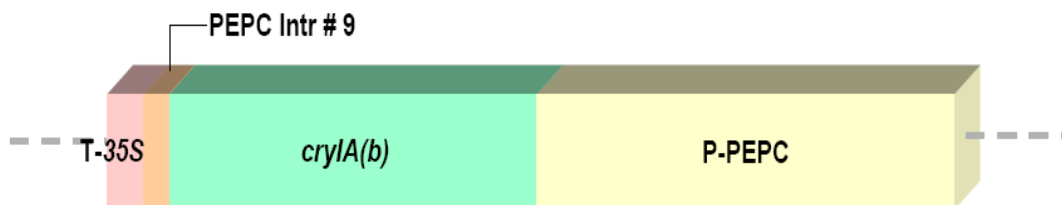


图 7. 受 PEPC 启动子调控的合成 *cryIA (b)* 基因示意图 (转自 Matsuoka *et al.*, 2000)。

草胺磷除草剂耐性

草胺磷除草剂耐性基因 (*bar* 基因), 源自常见土壤细菌 *Streptomyces hygroscopicus*, 受 CaMV 35S 组成型启动子转录水平的调控, 编码乙酰基转移酶 (PAT), 该基因在除花粉之外的所有植物组织内都有活性。s-一磷基麦黄酮 (Phosphinotricin, PPT), 谷氨酸-合成酶的抑制剂, 是草胺磷的活性部分。PPT 的除草活性是通过抑制谷氨酸-合成酶实现的, 导致植物体内积累致命量的氨。PAT 能催化 PPT 的乙酰化, 从而解除它的除草活性。

PPT 的 L-异构体 (L-PPT) 是广泛使用的广谱除草剂。L-PPT 是除草剂草胺磷的有效成分, 是由 Hoechst 开发的, 命名为 BASTA。这个异构体是谷氨酸的结构类似物, 也是谷氨酸合成酶的底物 (见图 8 L-PPT 与谷氨酸的比较)

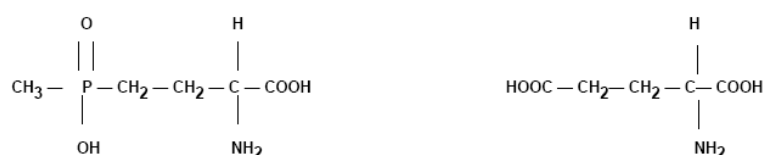


图 8. PPT 的 L-异构体 (左) 与谷氨酸 (右) 的比较

最初, L-PPT 是 *Streptomyces viridochromogenes* 分离得到, 此菌只合成 PPT 的 L-异构体。合成的草胺磷是 PPT 的 D- 和 L-异构体(D-PPT 没有除草活性)的体积分子浓度相等的、外消旋的混合物, 因为它对其他常见的乙酰基转移酶底物, 包括丙酮酸、胆碱或丝氨酸没有其他活性, 所以 PAT 特异性地作用于 PPT。

在模拟哺乳动物胃环境下, 用大肠杆菌 (*E. coli*) 表达的 PAT, 做体外消化研究, 显示此蛋白与常规食用蛋白降解方式一样。草胺磷除草剂耐性基因是作为选择标记被共同转化, 它还可选择性培养基上辨别成功转化的胚胎, 而且可在植物繁殖期间追踪引入的新基因。据报道 (FSANZ, 2000), 分子生物学数据显示品系 Bt-176 含有一个拷贝的受到来自花椰菜花叶病毒的 35S 启动子和 35S 终止子 (分别是 P-CaMV 35S 和 T-CaMV35S) 的转录水平的调控 *bar* 基因。(见图 9)

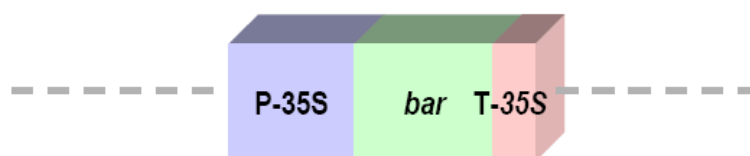


图 9. *bar* 基因示意图 (转自 Matsuoka *et al.*, 2000)

研制方法

纯系玉米 CG00526 (*Zea mays* L.) 用两个质粒通过基因枪转化法得到玉米品系 Bt-176。两个合成的 *cryIA (b)* 基因共同克隆到一个质粒载体中 (pCIB4431)，另一个质粒载体 (pCIB3064) 包含从土壤细菌 *Streptomyces hygroscopicus* 分离出来的除草剂耐性基因 (*bar*)，这两个载体通过未成熟胚胎的微注射轰击引入玉米品系 CG00526。转化植株的分子生物学分析表明每个质粒结构体的两个或多个拷贝能整合到玉米的基因组中，分析方法和 Northern blot 分析表明受细菌启动子调控 (用来在细菌中筛选载体) 的氨苄青霉素抗性基因 (*bla* 基因) 在植物的叶子组织和花粉中都未表达。两个独立的转基因玉米事件被用来进一步杂交和特性化：品系 171 和 176 (Koziel *et al.*, 1993)。

其他性质的研究肯定了 Bt-176 玉米中存在 *cryIA (b)* 基因 (Koziel *et al.*, 1993)、*bar* 和 *bla* 基因 (Privalle, 1994) Food Standards Australia New Zealand (FSANZ, 2000) 报道的数据也表明在 Bt-176 中，有六个拷贝的 *cryIA (b)* 基因和 *bla* 基因，至少二个拷贝的 *bar* 基因 (包括 35S 启动子)，结果与 Bt-176 玉米 DNA 的 Southern 分析结论一致 (Privalle, 1994)

遗传稳定性

据报道 (FSANZ, 2000)，生长在温室中的植物的叶子和花粉合成 CRYIA(b)蛋白和 PAT 蛋白，经过连续四代回交后，性状仍然是稳定的。隔离分析显示欧洲玉米螟 ECB 抗性和除草剂耐性性状按照孟德尔连锁遗传规律分离。一项对 3240 个植株的研究表明，只有 5 个植株 (0.15%) 对草胺磷有耐性，但对 ECB 幼虫的破坏敏感。

管理决议

1995 年 8 月，美国环境保护局有条件地通过了在 2000 年之前的 Event176 衍生来的大田玉米的商业化。而 1997 年 1 月 23 日的欧盟法令 97/98/EC 批准该玉米品系的商业化。

该品系玉米将用来种植、种子和青贮饲料的生产、动物谷类饲料及用于工业加工的谷类 (Commission Decision 97/98/EC)。

参考文献

- Agbios database on Essential Biosafety. Molecular Characterization of MON810 inserted DNA.
<http://www.essentialbiosafety.info/dbase.php>
- Armstrong, C. L., Green, C. E. and Phillips, R.L. (1991). Development and availability of germplasm with high type II culture formation response. *Maize Genetics Cooperation NewsLetter* **65**, 92-93.
- BATS (2003). Genetically Modified (GM) Crops: molecular and regulatory details.
<http://www.gmo-watch.org>
- Canadian Food Inspection Agency, Plant Products Directorate, Plant Biosafety Office. *Decision Document DD96-09: Determination of Environmental Safety of Event 176 Bt Corn (Zea mays L.) Developed by Ciba Seeds and Mycogen Corporation.*
<http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/pbo/dd/dd9609e.shtml>
- Canadian Food Inspection Agency, Plant Products Directorate, Plant Biosafety Office. *Decision Document DD95-05: Determination of Environmental Safety of Monsanto Canada Inc.'s Glyphosate Tolerant Soybean (Glycine max L.) Line GTS 40-3-2.*
<http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/pbo/dd/dd9505e.shtml>
- Canadian Food Inspection Agency, Plant Products Directorate, Plant Biosafety Office. Decision Document 97-19: Determination of the Safety of Monsanto Canada Inc.'s YieldgardTM Insect Resistant Corn (*Zea mays* L.) Line MON810.
(<http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/pbo/dd/dd9719e.shtml>)
- Commission Decision 97/98/EC of 23 January 1997 concerning the placing on the market of genetically modified maize (*Zea mays* L.) with the combined modification for insecticidal properties conferred by the Bt-endotoxin gene and increased tolerance to the herbicide glufosinate ammonium, pursuant to Council Directive 90/220/EEC. (OJ L 31, 1.2.1997, p. 69).
- Commission Decision 96/281/EC of 3 April 1996 concerning the placing on the market of genetically modified soya beans (*Glycine max* L.) with increased tolerance to the herbicide glyphosate, pursuant to Council Directive 90/220/EEC. (OJ L 107, 30.4.1996, p. 10).
- Commission Decision 98/294/EC of 22 April 1998 concerning the placing on the market of genetically modified maize (*Zea mays* L. line MON810), pursuant to Council Directive 90/220/EEC. (OJ L 131, 5.5.1998, p. 33).

Food Standards Australia New Zealand – FSANZ (formerly Australia New Zealand Food Authority - ANZFA) (2000). Draft risk analysis report. Food produced from insect-protected Bt-176 corn. Application 385.

http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/A385%20FA.pdf

Koziel, M.G. et al. (1993). Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *BIO/Technology* **11**, 194–200.

Lee, T.C., Zeng, J., Bailey, M., Sims, S.R., Sanders, P.R. and Fuchs, R.L. (1995). Assessment of equivalence of insect protected corn- and *E. coli*-produced *B.t.k.* HD-1 protein. *Plant Physiol. Suppl.* **108**, 151.

Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyota, M., and Hino, A. (2000). A method of detecting Recombinant DNAs from four lines of genetically modified maize. *Journal of Food Hygienic Society of Japan* **41**, 137-143.

Monsanto Company (2000). Updated Molecular Characterization and Safety Assessment of Roundup Ready Soybean Event 40-3-2. *Monsanto Report*, Product Safety Centre.

Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X., Re, D.B., LaVallee, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholtz, D.A., Peschke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B. and Kishore, G.M. (1995). Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Science* **35**, 1451–1461.

Padgett, S.R., Re, D.B., Barry, G.F., Eichholtz, D.E., Delannay, X., Fuchs, R.L., Kishore, G.M., and Fraley, R.T. (1996). New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready gene. In Duke, S.O. (ed.) *Herbicide-Resistant Crops. Agricultural, Economic, Regulatory and Technical Aspects*. CRC Lewis Publishers., pp 53-84.

Privalle, L. (1994). Quantification of Cry1A(b) and PAT proteins in Bt corn (corn) tissues, whole plants and silage. Performing laboratory: Ciba Seeds Agricultural Biotechnology Research Unit, Ciba-Geigy Corporation, Research Triangle Park, NC, USA. Study No CAB-009-94

Windels, P., Taverniers, I., Depicker, A., Van Bockstaele, E. and De Loose, M. (2001). Characterisation of the Roundup Ready soybean insert. *European Food Research Technology* **213**, 107-112.