

Metoder til påvisning af uønsket plantemateriale i afgrøder og frøpartier

af Vibeke Simonsen og Gösta Kjellsson

Formålet med det foreliggende kapitel er at fremkomme med generelle oplysninger om, hvorledes uønskede planter eller gener kan påvises i en afgrøde eller i et frøparti.

Spredning af planter er blevet af vigtighed med de dyrkningsformer, der praktiseres i moderne landbrug. Med de kommende frigivelser af genetisk modificerede (GM) planter i landbruget vil der opstå et øget behov for viden om omfanget af den spredning, der vil forekomme af GM frø og planter til økologiske som konventionelle afgrøder. Den øgede risiko for spredning af GM materiale har allerede medført et krav til isoleringsafstande mellem marker med GM og ikke-GM afgrøder af samme art. Dyrkning af GM-afgrøder vil ligeledes afstedkomme øget krav til sædskifte og til håndteringen af afgrøden under transport og i tørrerier.

Afhængig af plantens biologi kan spredning foregå på flere måder enten vegetativt, via pollen eller via frø. Den eventuelle vegetative spredning kan reduceres ved mekanisk behandling eller ved hjælp af herbicider. Pollenspredning kan undgås ved at benytte hansterile planter, men det kræver naturligvis et yderligere indgreb i plantens genetiske materiale. I frøspredningen indgår dels plantens naturlige spredning, der ofte er ændret gennem forædling for at begrænse tidligt frøtab under høst, dels menneskeskabt spredning med høst og håndtering derefter. For mange af græsarterne vil frøene blive spredt med vinden, bl.a. vægten af frøet er afgørende for spredningens rækkevidde. Gennemgående er kornarternes (hvede, byg, majs, havre, rug)) frø tungere end græsfrø, og vindspredning har kun begrænset betydning. Til gengæld kan spredning ved hjælp af dyr og fugle have en effekt, især hvis frøene kan overleve et ophold i dyrets/fuglens fordøjelseskanal. I de fleste tilfælde vil hovedparten af frøene falde til jorden i nærheden af moderplanten. Høst af afgrøden og efterfølgende håndtering af den efter høst har langt større betydning for frøspredning. Den menneskeskabte påvirkning er således af afgørende betydning for spredningen af landbrugsplanterne. I forbindelse med høst af en mark vil en del af frøene ende som spildfrø, og afhængigt deres evne til at overleve vil de, hvis de ikke bliver spist af fugle eller dyr eller rådner, indgå i markens frøbank.

Da frø fra tidligere dyrkningssæsoner eller fra utilsigtet forurening i udsæd kan forekomme på en mark, er det specielt for GM afgrøder af betydning at påvise disse i en konventionel eller økologisk afgrøde. Frø fra GM-sorter bærer en eller flere genetiske markører, som kan genkendes ved hjælp af forskellige analysemetoder. Disse metoder vil blive i afsnittet om metoder til påvisning af genetiske markører.

Genetiske markører

En genetisk markør er en del af organismens arvemateriale (genom), altså et stykke DNA, som på en eller anden måde kan genkendes, enten under anvendelse af molekylærbiologiske metoder eller ved ydre kendetegn på planter (torn, bladfligstørrelse etc.). En særlig gruppe af genetiske markører udgøres af gener, som er ansvarlig for et erkendbart produkt, enten direkte i form af et protein, indirekte som en morfologisk egenskab, f. eks. farve, eller som en regulator for andre gener, hvorved gen-ekspressionen begrænses eller forøges. Alle gener er tilstede i hver eneste celle, men det er ikke alle celler, der har behov for at lave genprodukter af alle gener.

For år tilbage blev der talt om hypotesen et gen - et polypeptid (protein) (Srb et al. 1965), men med DNA analyseteknikkerne er man i stand til at genkende langt flere dele af DNA-molekylet, også de dele, som man på nuværende tidspunkt ikke ved, om de har nogen funktion. Sammenhængen mellem produkt og gen kan forenklet fremstilles som i nedenstående figur (Fig. 1). DNA står for den del af DNA, der udgør det pågældende gen, som overfører information til messenger RNA (mRNA), som via en række kemiske reaktioner sørger for opbygningen af det ønskede protein.

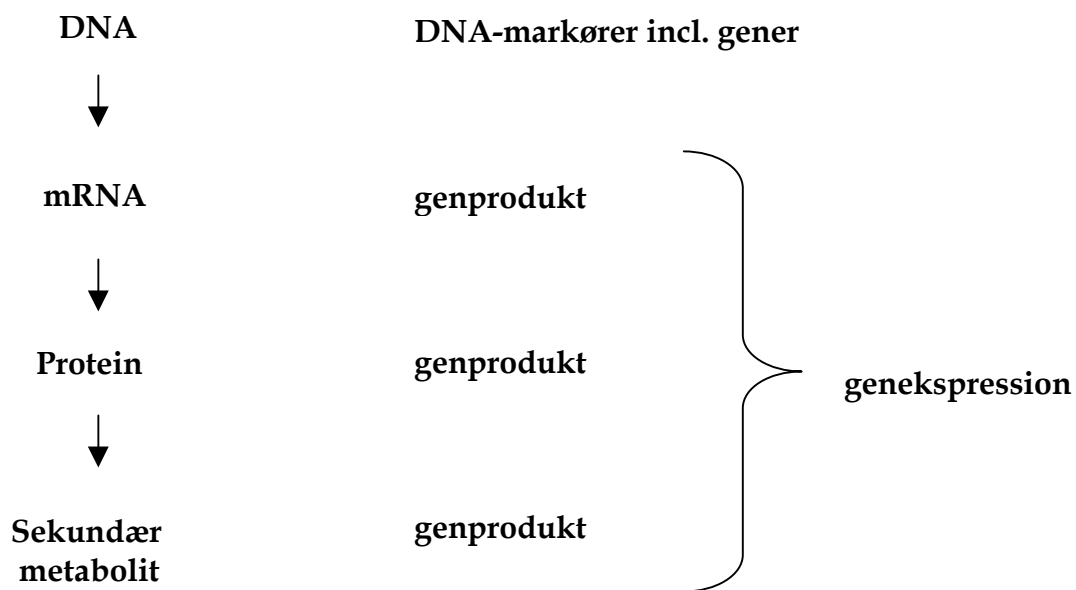
Figur 1. Overførsel af information fra et gen til et protein

DNA→mRNA→protein

For at vende tilbage til karakteren farve skyldes den et farvet molekyle, som bliver dannet gennem en enzymatisk omdannelse af et kemisk stof til et farvet stof, hvor enzymet er ansvarlig for den pågældende reaktion. Da enzymer er proteiner med katalytiske egenskaber (dvs. fremmer

en kemisk reaktion), så er enzymer og andre proteiner et direkte udtryk for det genetiske materiale, der findes i individet, og farven betinget af en enzymatisk reaktion et indirekte produkt af genet. Kemiske komponenter som f. eks. farve eller planterens kemiske forsvarsstoffer, ofte kaldet naturstoffer, kan betegnes som sekundære metabolitter, da ikke alle planter f. eks. har de samme naturstoffer. Sammenhængen mellem de forskellige genetiske markører er vist i fig. 2.

Figur 2. Oversigt over genetiske markører og sammenhængen mellem dem

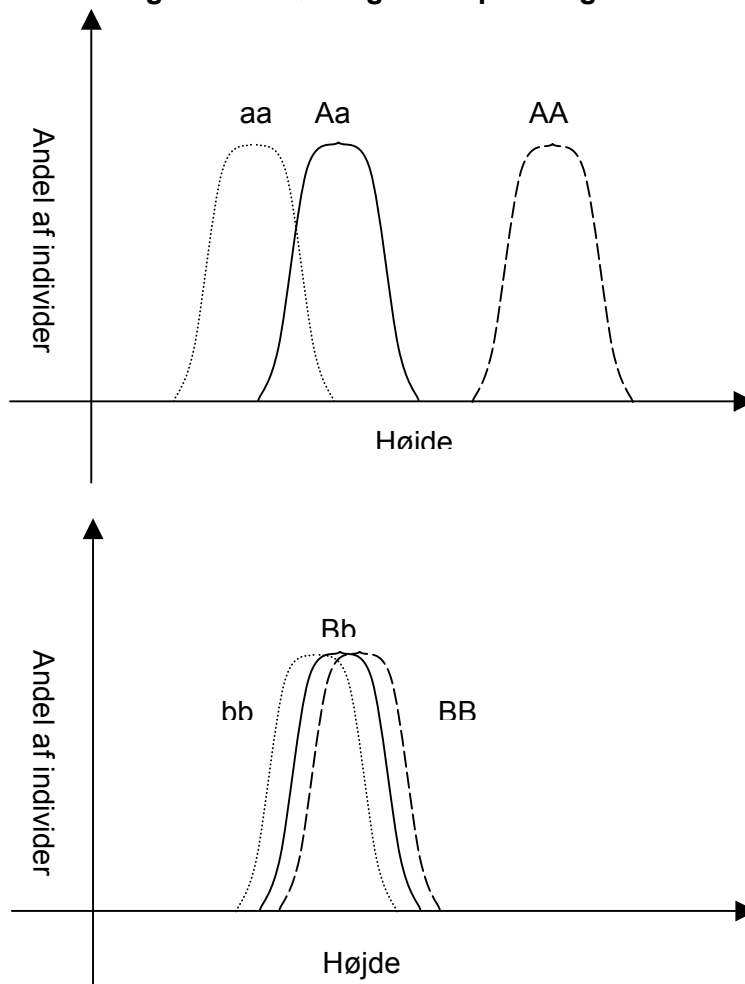


DNA er organiseret på kromosomer, som også kan betragtes som genetiske markører, da kromosomernes antal og form kan variere inden for en art. Desuden kan individets form, størrelse, produktion af afkom o. lign. anvendes som markører, såfremt disse egenskaber kan gruppere individerne i forskellige klasser og dermed påvise tilstedeværelsen af uønsket plantemateriale i afgrøden. Her må der skelnes mellem to former for markører, nemlig de sortsspecifikke markører, som er diagnostiske for de enkelte sorter og de hyppighedsrelaterede markører, som har en sortsspecifik fordeling. De diagnostiske markører kan anvendes både på planter og på frøpartier, mens de markører, som har en given fordeling i en sort, er mest velegnet til at kontrollere frøpartier. Egenskaber som form, størrelse, stråstivhed etc. er ofte resultatet af et samspil mellem mange gener og udgør den del af genetikken, der betegnes kvantitativ genetik. Et genprodukt som

et protein er et resultat af et gen, og et sådant gen, hvor der er en direkte sammenhæng mellem gen og produkt, kaldes ofte et "major gene" (Jones et al. 1997).

En markør betegnes genetisk markør, såfremt den nedarves efter de mendelske arvelighedslove, men den genetiske markør har ikke nødvendigvis en kendt funktion. Hvis flere markører analyseres på en række individer, vil der af og til blive fundet afvigelser fra de mendelske love, hvilket kan skyldes, at nogle af markørerne er koblede og sidder tæt ved hinanden på samme kromosom. Koblede markører er af stor betydning for kortlægning af en arts genom. En særlig gruppe af markører er "quantitative trait loci" (QTL), som er DNA markører, der er relateret til ønskede egenskaber hos afgrøden, f. eks. stråstivhed. QTL er ikke nødvendigvis et gen for den pågældende egenskab. En sammenhæng mellem to QTL og en erkendbar effekt (f. eks. højde) er vist i fig. 3. Begge QTL har to allele former, altså et individ kan være AA, Aa eller aa for den ene QTL og BB, Bb eller bb for den anden. På figuren er vist sammenhæng mellem effekten og fordelingen af individer med en given genotype.

Figur 3. Sammenhæng mellem QTL og effekt på en egenskab f.eks. højde



Af Fig. 3 ses det klart, at QTL-markøren med typerne AA og Aa har en betydelig effekt på egenskaben, hvorfor denne QTL må være tæt koblet til egenskaben. Typerne BB, Bb og bb har næsten samme virkning på egenskaben, hvorfor egenskaben er ikke er tæt koblet til den markør. QTL som markører for forskellige egenskaber er vigtige for en hurtig udvælgelse af individer for et fortsat avlsarbejde.

Metoder til påvisning af genetiske markører

Som nævnt ovenfor er DNA fundamentet for genetiske markører, dels ved selv at kunne anvendes som markør og dels som basis for genprodukter. En udmærket gennemgang af molekylære genetiske markører, om end lidt forældet, er skrevet af Bachmann (1994) og af Jones et al. (1997).

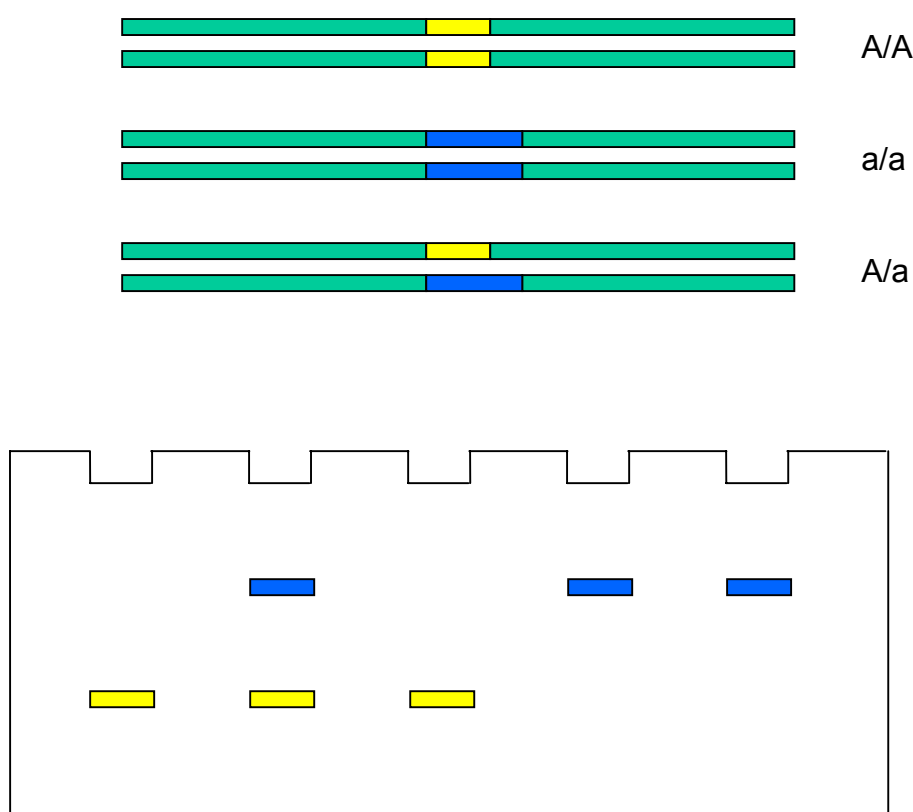
DNA-hybridisering

En af de første metoder, der blev benyttet til at påvise forskelle i DNA og dermed i genomet, var DNA hybridisering mellem DNA fra forskellige individer eller arter. Metoden benytter sig af, at det dobbeltstrengede DNA ved opvarmning bliver separeret i to enkeltstrengede, som ved afkøling smelter sammen igen. Når produktet opvarmes igen, vil det igen deles i to enkeltstrengede. Hvis man blander DNA fra forskellige arter sammen, udsætter det for en opvarmning og afkøling og igen en opvarmning, vil temperaturen for 50 % separation i enkeltstrengede blive nedsat, da en del af det dobbeltstrengede DNA består af en DNA streng fra den ene art og en fra den anden. Da nucleotidsammensætningen i to arter er forskellig, så vil der være mange steder, hvor de to DNA strengede ikke passer sammen. Dermed vil de ved opvarmning lettere blive separerede, se Werman et al. (1996) for beskrivelse af metoden. Teknikken er mest velegnet til at undersøge forskelle mellem arter og dermed evolution, den vil næppe blive benyttet i forbindelse med påvisning af GMO'er.

RFLP (Restriction fragment polymorphism) metoden

Metoden er bl. a. omtalt af Dowling et al. (1996). Den er baseret på isolering af DNA, anvendelse af restriktionsenzymmer og "Southern blotting". Restriktionsenzymmer er enzymer, der stammer fra bakterier, og som genkender specifikke sekvenser af DNA (Smith & Wilcox 1970, Kelly & Smith 1970). Den genkendte sekvens spaltes på en bestemt måde. Southern blotting er først en adskillelse DNA-stykkerne ved hjælp af elektroforese, en teknik der separerer molekyler på grund af deres ladning og/eller størrelse. Dernæst overføres de adskilte DNA stykker til en nylonmembran og påvises ved hjælp af en probe. En probe er et lille stykke DNA, som har en sekvens, der svarer til de stykker, der er blevet skåret med restriktionsenzymet. Desuden er proben mærket på en måde, så de steder, hvor der er de rette sekvenser, vil der fremkomme en farve eller en radioaktiv forbindelse. En af fordelene ved RFLP er, at heterozygoter kan erkendes, idet RFLP er en codominant markør, se Fig. 4. Metoden er velegnet til populationsundersøgelser og kan anvendes til sporing af uønsket plantemateriale i afgrøden, men er ikke den mest hensigtsmæssige metode i forbindelse med GMO'er, da den ikke nødvendigvis påviser de indsatte DNA-stykker.

Figur 4. RFLP fra 5 individer. Øverste halvdel af figuren viser DNA, hvor det gule hhv. blå stykke er flankeret af to restriktionssekvenser, det gule benævnes A og det blå a. Genotyperne af individerne er angivet til højre for DNA. De fem analyserede individer (fra venstre mod højre) har genotyperne A/A, A/a, A/A, a/a og a/a.

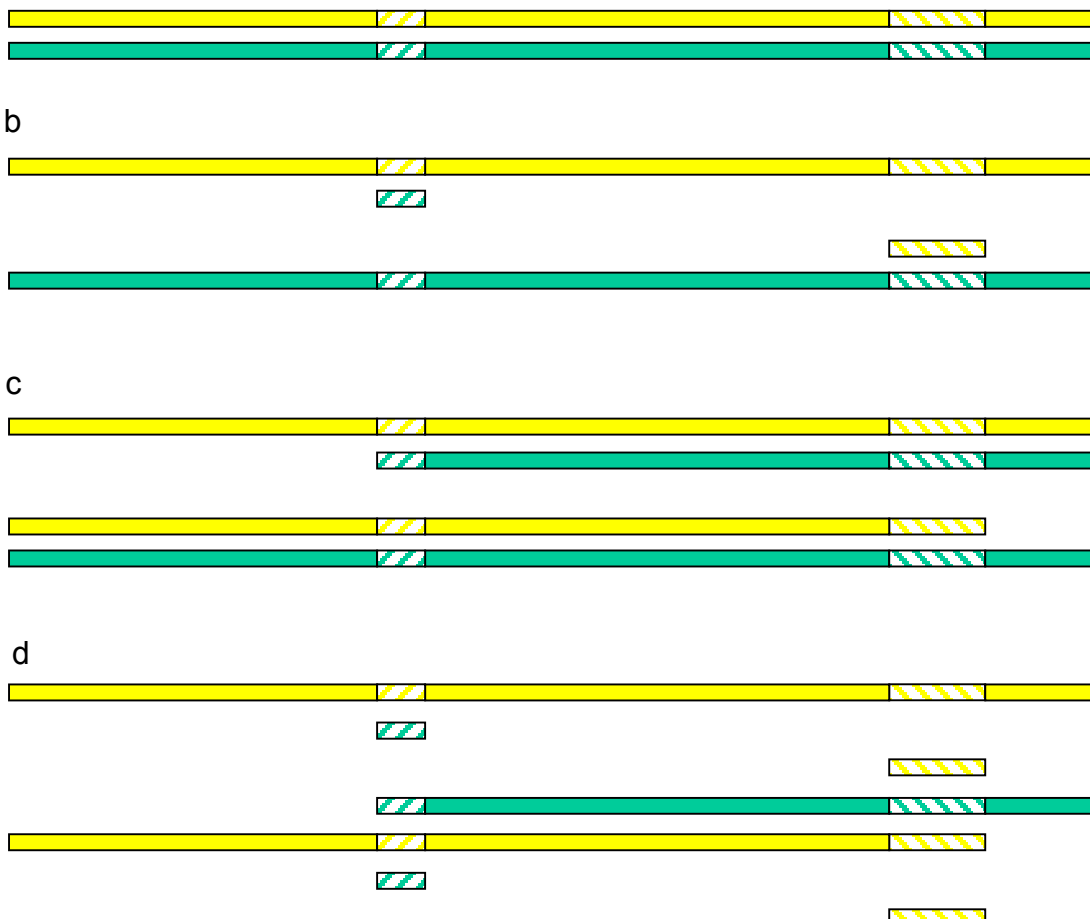


En variant af denne metode er analyse af minisatellitter, som benytter en probe, der består af en sekvens på 10-50 baser. Derved fås såkaldte DNA-fingerprints, som kan være karakteristiske for sorterne. Også denne metode detekterer ikke nødvendigvis genetiske modifikationer.

PCR metode

Med udviklingen af "polymerase chain reaction" (PCR) metoden tog anvendelsen af DNA-markører fart. Metoden blev publiceret i 1986 af Mullis og medarbejdere og har vundet stor udbredelse siden. Fordelen ved metoden er, at den kræver meget lidt DNA for at virke. Ved hjælp af primere (korte nucleotid sekvenser), nucleotider, Taq-polymerase (et enzym der kobler nucleotider sammen) og lidt DNA kan bestemte stykker opformeres i meget stort antal, se fig. 5.

Figur 5. PCR reaction, a) separation af det dobbeltstrengede DNA, b) binding af primere (de små DNA-stykker), c) opformering af DNA, d) separation af DNA- strengene og binding af primere, e) opformering. De med stjerne mærkede DNA stykker vil blive de hyppigst forekommende efter gentagne separation af DNA strenge og opformering.



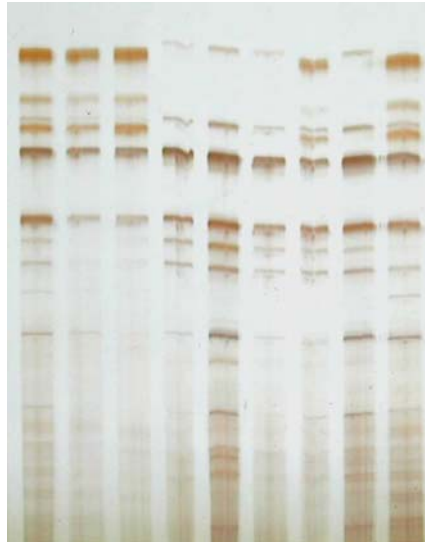


Ved at anvende primere, som er specifikke for de indsatte gener i en GM plante, er det muligt at påvise forekomsten af genetisk modificeret plantemateriale, både i frø og blandt planter.

RAPD og ISSR-metode

PCR-metoden er basis for en række DNA analyse-metoder. En af dem er random amplified polymorphic DNA (RAPD), som består af en PCR-reaktion, hvor der benyttes en tilfældig primer, som ofte er ti baser lang. Herved bliver kun den ene DNA streng opformeret de steder, hvor primeren kan hæfte sig. De fremkomne DNA stykker adskillelse ved elektroforese og påvises ved en kemisk reaktion. RAPD-markører fremtræder som dominante markører, altså enten er de tilstede eller ikke tilstede. RAPD metoden har været brugt til en række undersøgelser, blandt andet som markører i en *Brassica campestris-alboglabra* addition line (Jørgensen et al. 1996) og til påvisning af overførsel af gener fra en plantearart til en anden inden for *Brassica*-slægten (Jørgensen et al. 1998). En videre udvikling af denne metode er ISSR (inter simple sequence repeats), som benytter sig af, at der rundt om i genomet findes sekvenser bestående af 1-5 baser, som gentages mange gange (f. eks. CATCATCATCATCATCAT osv.). En sådan gentagen sekvens kaldes en microsatellit eller en simple sequence repeat (SSR). Ved at lave en primer, der består af f. eks. CAT fem gange og med tre til fem baser i den ene ende, kan man få opformeret de stykker af DNA, der ligger mellem de såkaldte microsatellitter. ISSR-markører er ligesom RAPD-markører dominante, se fig. 6. Af fig. 6 fremgår det, at der er to DNA profiler for den pågældende ISSR-primer, og de to profiler repræsenterer hver sin rapssort. Såvel RAPD som ISSR er velegnede metoder til sortsbestemmelse, men kan ikke alene benyttes til påvisning af GM planter.

Figur 6. ISSR af planter fra to rapssorter. Fra venstre mod højre, 3 planter af sort 1, 3 planter af sort 2, 1 plante af sort 1, 1 plante af sort 2 og 1 plante af sort 1.



Microsatellit eller SSR metode

Analyse af microsatellitter eller SSR har vundet stor udbredelse. Her benytter man to veldefinerede primere, som betyder, at der bliver dannet produkter fra begge DNA strenge, hvorfor disse markører er codominante. Det betyder, at hvis de to DNA strenge har et forskelligt antal gentagelser af den korte sekvens f. eks. CAT, vil det vise sig som to bånd på en gel efter elektroforese. Resultatet vil ligne det, der er vist i Fig. 4. Et overblik over anvendelsen af mikrosatellitter fra planter er præsenteret af blandt andre Gupta og Varshney (2000). Metoden af dækker ofte en meget høj grad af genetisk variation, men kan alene ikke benyttes til påvisning af GM planter.

AFLP (amplified fragment length polymorphism) metode

En metode, der kombinerer PCR og restriktion enzymer, er amplified fragment length polymorphism (AFLP). Efter en række trin fås separation af en masse DNA stykker på en gel, som har vist sig at være meget effektiv for analyse af mange plantearter, f.eks. til eftervisning af

hybrider mellem *Brassica napus* og *B. rapa* (Warwick et al. 2003). Metoden kan ikke alene benyttes til påvisning af GM planter.

Sammenfatning af DNA metoder

Denne oversigt over metoder til bestemmelse af DNA-markører er ikke udtømmende, da der til stadighed fremkomme nye metoder og variationer over de tidligere metoder. Der er fokuseret på metoder, som vil være anvendelige til påvisning af uønsket plantemateriale i en afgrøde.

RNA markører

RNA er ikke i samme omfang som DNA blevet benyttet som markør. mRNA dannes først, når et bestemt gen kommer til udtryk, da mRNA er det første trin i oversættelsen af DNA til et genprodukt (Fig. 1). Mange af de metoder, der benyttes til bestemmelse af DNA-markører, kan anvendes på RNA, Southern blotting (se afsnittet RLFP metode) benævnes Northern blotting, når det er mRNA, der skal påvises. En særlig PCR baseret metode bruges til at kvantificere mRNA, hvilket kan anvendes til påvisning af indsatte gener. Stabiliteten kan være et problem i forbindelse med at benytte mRNA som genetisk markør (se f. eks. Ylstra og McCormick 1999). Derfor går man ofte en anden vej, idet der laves en DNA kopi af mRNA, som udmærker sig ved at være mere stabil, den form for DNA kaldes copy DNA (cDNA). Endelig kan påvisning af det pågældende protein være et alternativ til mRNA-analyser.

Immunologisk metoder

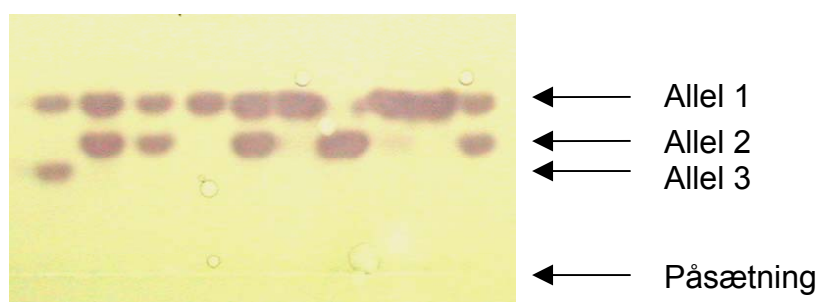
Proteiner har været benyttet som genetiske markører gennem mange år. To forhold har spillet kraftigt ind vedrørende deres anvendelse som genetiske markører. En del af dem har immunologiske egenskaber, dvs. at de reagerer et for individet fremmed protein. En anden del har katalytiske egenskaber, dvs. at de kan få en kemisk reaktion til at foregå. Hver af disse egenskaber kan udnyttes på forskellig måde og sammen med proteiners elektriske ladning, som er afhængig af deres aminosyresekvens, kan disse egenskaber kombineres med elektroforese. De immunologiske egenskaber er udnyttet på mange måder (se f. eks. Axelsen et al. 1973), og separation ved hjælp af elektroforese efterfulgt af overførelse til en nylon membran med et passende antistof kaldes for

Western blotting. En anden teknik, der benytter de immunologiske egenskaber, er ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), som har vundet stor udbredelse. Metoden kan udføres i titerplader med 96 brønde. Hver brønd indeholder et protein, et antigen, som svarer til det protein, antistof, som skal påvises. Først tilsættes antistoffet (antistof 1), som binder sig til antigenet, og endelig tilsættes et antistof, der passer til antistof 1, kombineret med et molekyle, der vil udvikle en farve, såfremt antistof 1 var til stede. Metoden er meget effektiv og benyttes til påvisning af specifikke proteiner. En variant af denne metode er de såkaldte "lateral flow sticks", som basalt baserer sig på det samme princip, der benyttes i ELISA. De kan benyttes til at påvise proteiner f. eks. Bt-toksiner, som ofte er indsat i majs som beskyttelse mod insektangreb. Fælles for de nævnte teknikker er, at der skal udvikles specifikke antistoffer, hvilket kan være et større arbejde og kræve avancerede teknikker og et særdeles veluddannet personale. Anvendelsen af "lateral flow sticks" er relevant til påvisning af tilstedeværelse af GM produkter i frø- og kornblandinger, hvor man ikke ønsker disse. Metoden anvendes i dag for visse genprodukter og er en hurtig og effektiv test, som kan udføres af landmanden.

Isozym analyse

Analyse af proteiner med katalytiske egenskaber (enzym) udnytter også proteinernes elektriske ladning. Separation foregår ved hjælp af elektroforese, se foregående afsnit. Efter separationen tilsættes det nødvendige substrat, den katalytiske reaktion foregår, hvor det specifikke enzym findes og giver et resultat som vist i fig. 7. Ofte vil der forekomme flere proteiner med forskellige elektriske ladninger, men samme katalytiske egenskab. Hvis de påviste former af enzymet er et resultat af et gen med flere alleler, taler man om et allozym. I fig. 7 er der vist tre allele former af enzymet phosphoglucomutase. Hvis de påviste former er betinget af flere gener, taler man om isozymer, altså isozymer er overordnet allozymer.

Figur 7. Enzymet phosphoglucomutase fra ti individer, genotyper fra venstre mod højre, 1/3, 1/2, 1/2, 1/1, 1/2, 1/1, 2/2, 1/1, 1/1 og 1/2.



Metoden er relativ simpel og har været brugt til sortsadskillelse (f. eks. Adam et al. 1987), men er ikke så velegnet som de PCR-baserede DNA metoder i forbindelse med GM-planter, med mindre der specifikt er indsat et enzym med en særlig allelform, f.eks allel 3, se Fig. 7.

Sekundære metabolitter

Sekundære metabolitter som f. eks. ændret stivelsessammensætning kan erkendes med forskellige kemiske metoder. En ofte benyttet metode til bestemmelse af sekundære metabolitter er HPLC (high performance liquid chromatography). Det skal nævnes, at en række andre kemiske analysemetoder kan komme ind i billedet, afhængigt af hvilke komponenter, der skal påvises.

Analysemetoder, konklusioner

Det var kort fortalt de molekylære metoder, som kan anvendes i forbindelse med påvisning af uønsket plantemateriale. Vedrørende sortsbestemmelse benytter landbruget på nuværende tidspunkt ingen af de nævnte molekylære metoder, men baserer sig udelukkende på morfologiske markører, som f. eks. bladernes facon, behåring eller andet, der kan skille sorterne fra hinanden. Der har været en vis tøven med at inddrage de molekylære markører i sortsbestemmelsen, da en ny sort ikke blot skal have en ændring i en molekylær markør, men også have en ændring i agronomiske karakterer så som høstudbytte, høsttidspunkt, resistens over for forskellige sygdomsfremkaldende organismer o. lign.

Sammenfattende kan det siges, at, når det gælder sporing af GM planter, er DNA-metoder, der kan påvise det/de indsatte gener, at foretrække (se f. eks. Dietzgen et al. 1999, Kota et al. 1999). Princippet er anvendelse af prober, svarende til det/de indsatte gener, og af en Southern blotting eller en PCR-reaktion, der benytter sekvenser fra det/de indsatte gener som primere. I begge tilfælde kræver påvisningerne gode laboratoriefaciliteter og veluddannet personale. Udviklingen af dot blots og micro arrays, hvor tilstedeværelsen af hhv. et gen eller mange gener kan påvises hurtigt, er sandsynligvis også et område, der vil blive inddraget under metoder til bestemmelse af genetisk modificerede planter. Ved påvisning af DNA i de indsatte gener får man blot at vide, at

generne findes i organismen, men ikke at vide, om de er produktive. Hvis det er kun er af interesse at se på forekomsten af et genprodukt, bør man benytte påvisning af mRNA, proteiner eller kemiske produkter. Såfremt det er muligt, kan forskellige karaktertræk, som påvirker organismens form og udseende (morfologiske karakterer) også inddrages under egnede metoder til påvisning af uønsket plantemateriale.

Tabel 1 er en oversigt over de omtalte metoder, som alle kan benyttes i forbindelse med påvisning af GM planter, men det kræver under alle omstændigheder viden om de indsatte gener og om det benyttede plantemateriale.

Tabel 1. Oversigt over udvalgte analysemetoder for DNA og protein, deres forkortelser, forudsætninger og følsomhed med henblik påvisning af uønsket plantemateriale.				
Molekylær markør	Metode	Forkortelse	Forudsætter	Følsomhed
DNA	Hybridisering			Lav
	Restriction fragment length polymorphism	RFLP	Prober	Høj
	Random amplified polymorphic DNA	RAPD	Primere, PCR*	Lav
	Inter simple sequence repeats	ISSR	Primere, PCR	Middel
	Amplified fragment length polymorphism	AFLP	Primere, PCR	Høj
Protein	Immunologiske metoder		Antistof	Høj
	Isozym/isoenzym, herunder allozym			Lav

Genmodificerede planter af dyrkningsmæssig interesse i Danmark.

De plantearter, der er identificeret som særligt problematiske i GM-sammenhæng, er tre enkimbladede arter, almindelig rajgræs (*Lolium perenne*), italiensk rajgræs (*Lolium multiflorum*) og rug (*Secale cereale*), og tre tokimbladede, raps (*Brassica napus*), hvidkløver (*Trifolium repens*) og rødkløver (*Trifolium pratense*). For hver planteart gennemgås kort deres biologi, anvendte metoder til påvisning og adskillelse af sorter, evt. til adskillelse af nærtbeslægtede arter og påvisning af hybridisering med andre arter. Sortsadskillelse og hybridisering kan begge være af betydning i forbindelse med evt. genspredning, både den naturlige og den menneskeskabte, se tidligere afsnit.

Biblioteksdatabase "ISI Web of Science" blev benyttet til at finde artikler relevante for de enkelte planter med fokus på sorts- og artsadskillelse samt hybridisering med andre arter. Den anvendte søgeprofil bestod af det latinske plantenavn og relevante metodesøgeord (isozym, isoenzym, allozym, RAPD, ISSR, SSR, microsatellit, AFLP, DNA).

Almindelig rajgræs (*Lolium perenne*)

Denne græsart er meget udbredt i Danmark, se Tolstrup et al. (2003) og anvendes både som foder- og frøplante, desuden benyttes den ofte i blandinger til vedvarende græsdyrkning i områder, der benyttes til fritidsforhold. Alm. rajgræs er hovedsagelig fremmed-bestøvt og vind-bestøvet. Isozymer fra alm. rajgræs er blevet analyseret i flere populationer, se f. eks. Fernando et al. (1997) og såvel isozymmer som proteiner generelt blandt flere sorter (Gilliland et al. 2000). Fernando et al. (1997) fandt, at der var mere genetisk variation inden for sorten end mellem sorterne. Gilliland et al. (2000) observerede, at de undersøgte sorter kunne inddeles i grupper, der svarede til deres afstammingsforhold. Yderligere 28 landracer blev analyseret ved hjælp af isozymmer, og igen var den genetiske forskel mellem racerne ringe (Olivera et al. 1997a). Samme observation blev fundet af Loos (1994). Med anvendelse af RFLP var det muligt at adskille to sorter af alm. rajgræs (Yamada og Kishida 2003). Ved at bruge ISSR på populationer i Tunesien fandt Ghariani et al. (2003), at der var en høj grad af differentiering mellem bestandene. Udviklingen af SSR markører (Jones et al. 2001, Kubik et al. 2001) viste, at disse markører havde en langt bedre evne til adskillelse af sorter end hvad var set for isozymmer. AFLP er også en god teknik for sortadskillelse i rajgræs (Roldan-Ruiz et al. 2000, Guthridge et al. 2001, Roldan-Ruiz et al. 2001).

Differentiering mellem alm. rajgræs og andre græsser er ret væsentligt, da alm. rajgræs kan hybridisere med flere andre arter. Der er flere forfattere, der har beskæftiget sig med forskellen mellem *L. perenne* og *L. rigidum* (Balfourier et al. 1998, 2000) under anvendelse af isozymmer og analyse af chloroplast DNA. Ligeledes kan alm. rajgræs skelnes fra italiensk rajgræs *L. multiflorum* ved hjælp af isozymmer (Griffith og Banowetz 1992). RAPD har været benyttet til at se på forskellen mellem tre foder-græsser (Kölliker et al. 1999), og metoden kunne klart separere de tre arter fra hinanden.

Påvisning af hybrider mellem alm. rajgræs og *Festuca arundinacea* er blevet foretaget med RAPD-markører (Šiffelová et al. 1998), og for introgression af *Festuca mairei* i alm. rajgræs er benyttet RAPD og SSR (Wang et al. 2003). Også AFLP-teknikken er blevet anvendt til påvisning af hybrider mellem alm. rajgræs og italiensk rajgræs (Cresswell et al. 2001). Under alle omstændigheder er det nødvendigt at være opmærksom på, at hybridisering kan foregå. Tabel 2 viser forekomsten af hybrider inden for udvalgte græsarter i Danmark.

Tabel 2. Mulig genspredning og krydsninger fra dyrkede græsser til vilde eller naturaliserede græsarter.								
Genspredning og krydsninger er almindeligt forekommende eller findes hist og her (●); genspredning eller krydsninger forekommer sjældent eller meget sjældent (○). Angivelser i parentes er ikke direkte påvist i Danmark eller er usikre. Angivelser over hybrider er især baseret på Mikkelsen & Jørgensen (1997) og Højland & Pedersen (1994), men også Hylander (1953) har været anvendt. Manglende oplysninger er indikeret med spørgsmålstegn.								
	Oprindelig vildtvoksende eller naturaliserede græsarter og hybrider i Danmark							
Dyrkede foder- og plænegræsser	Strandsvingel (<i>Festuca arundinacea</i>)	Kæmpe-Svingel (<i>Festuca gigantea</i>)	Engsvingel (<i>Festuca pratensis</i>)	Rød Svingel (<i>Festuca rubra</i>)	Italiensk Rajgræs (<i>Lolium multiflorum</i>)	Alm. Rajgræs (<i>Lolium perenne</i>)	Hybrid-rajgræs (<i>L. perenne</i> x <i>L. multiflorum</i>)	Festulolium (<i>F. loliaceum</i> ; <i>L. perenne</i> x <i>F. pratense</i>)
Engsvingel (<i>Festuca pratensis</i>)	○	○	●		○	●		
Rød Svingel (<i>Festuca rubra</i>)				●				
Italiensk Rajgræs (<i>Lolium multiflorum</i>)	(°)	○	(°)		●	●		
Alm. Rajgræs (<i>Lolium perenne</i>)	○	○	●			●	●	
Hybrid-rajgræs (<i>L. perenne</i> x <i>L. multiflorum</i>)	(°)	?	(°)	?	(°)	(°)	(°)	°?
Festulolium (<i>F. loliaceum</i> ; <i>L. perenne</i> x <i>F. pratense</i>)	?	?	°?	?	(°)	(°)	°?	°?

Italiensk rajgræs (*Lolium multiflorum* Lam.)

Ligesom alm. rajgræs benyttes italiensk rajgræs til foder og til frøproduktion. Bestøvning foregår på lignende vis som hos alm. rajgræs og som tidligere nævnt kan de to arter hybridisere. Sammenlignet med alm. rajgræs er italiensk rajgræs undersøgt i langt mindre omfang, men genetisk diversitet mellem 16 landracer i Spanien og 3 sorter er belyst ved hjælp af morfologiske og

isozym-markører (Oliveira et al. 1997b). Ligesom hos alm. rajgræs var der mere variation inden for sorterne end mellem dem, men isozymer er heller ikke i dette tilfælde så velegnede til at adskille de forskellige sorter og landracer. ISSR kunne benyttes til at skelne *L. multiflorum* fra *L. perenne* (Pašakinskienė et al. 2000).

Hybridisering og introgression er påvist mellem italiensk rajgræs og *Festuca glaucescens* ved hjælp af isozymer (Ghesquière et al. 2000). Det skal nævnes, at tetraploid rajgræs blev anvendt i forsøget, polyploidisering kan give øget risiko for hybridisering med andre arter. AFLP blev ligeledes benyttet til påvisning af hybrider mellem de to rajgræsser (Cresswell et al. 2001), og der var tilsyneladende to grupper af hybrider, hvoraf den ene udviste stor lighed med italiensk rajgræs. Generelt må det konkluderes, at der spredning af gener fra italiensk rajgræs kan foregå via adskillige andre græsarter, se tabel 2.

Rug (*Secale cereale* L.)

Rug dyrkes i Danmark med henblik på foder- og frøproduktion (Tolstrup 2003). En del rug benyttes til helsædsensilage. Rug er en fremmedbestøver, og bestøvningen foregår ved vindens hjælp.

Den genetiske differentiering mellem rugsorter var relativ lav, når isozymer blev anvendt som analyseredskab (Ramirez og Pisabarro 1985, Ramirez et al. 1985). Ofte skulle der analyseres en større mængde frø ca. 200 for at få en relativ sikker sortsidentifikation (Adam et al. 1987). Variationen i allozymer blandt sorter og landracer viste som forventet af en vindbestøvende plante, at den genetiske variation var større inden for de enkelte sorter end mellem dem (Persson og von Bothmer 2000). Den observation blev yderligere bekræftet i en undersøgelse af nordeuropæiske landracer (Persson og von Bothmer 2002). RAPD-markører forekom at være mere velegnet til sortsidentifikation (Iqbal og Rayburn 1994). Det blev yderligere underbygget (Persson et al. 2001), men stadig var der mere variation inden for sorterne hver især end mellem dem. En undersøgelse, der sammenlignede isozym-, RAPD- og ISSR markører, viste, at kombinationen af de to metoder dels var velegnet til separation af sorter, og desuden en bedre overensstemmelse mellem resultater opnået med de genetiske markører og det kendte afstammingsforhold (Matos et

al. 2001). Mikrosatellitter eller SSR har måske et potentiale til sortsadskillelse, og har bl. a. været benyttet til påvisning af ændring i den genetiske sammensætning i sorter og deres opformering. Det er især et problem for samlinger i genbanker (Chebotar et al. 2002).

Baseret på isozymer var arter fra tre slægter sammenlignet (Hedge et al. 2002). I den undersøgelse var rug at betragte som fjern slægtning til de øvrige to slægter, *Aegilops* og *Amblyopyrum*, og som sådan klart adskilt fra repræsentanter fra de to slægter. Det bør nævnes, at den rug, der indgik i undersøgelsen, var ikke-dyrket rug.

Vedrørende hybridisering med andre arter er det nævnt, at der findes hybrider mellem rug og *S. montanum*, men det er ikke angivet, hvor let de to arter hybridiserer (Khavkin et al. 1996).

Raps (*Brassica napus*)

Raps dyrkes i Danmark som en vekselafgrøde, da der helst skal gå 4-6 år mellem afgrøderne (Tolstrup et al. 2003). Raps benyttes mest til fødevarer og indgår også i foderblandinger. I meget begrænset omfang benyttes olien til energiformål.

Rapsfrø kan overleve i dyrket jord op til 10 år eller mere (Vaughan et al. 1976 citeret af Hails et al. 1997). Hails et al. (1997) beskriver i deres undersøgelse, at den type genetisk modificeret raps, som de benyttede, kun overlevede i et år, det bør tilføjes, at de valgte habitater var alt andet end produktionsjord. Desuden påviste forfatterne, at der var forskel på modificeret og ikke modificeret raps' evne til at overleve, hvor den modificerede raps havde den ringeste overlevelsessevne. Om det var et udtryk for en tilfældig hændelse, kunne ikke afgøres ud fra forsøget.

Raps har både fremmed- og selvbestøvning. Bestøvningen foregår enten ved insekters (biers) eller vindens hjælp. Raps er kendt for at kunne hybridisere med en række andre arter (Tolstrup et al. 2003). GM raps har været markedsført i en længere periode, og forskellige egenskaber er blevet indsat. På nuværende tidspunkt er ingen GM raps godkendt i Danmark eller i EU, men der er et par sager under behandling.

Sammenlignet de øvrige arter omtalt i dette kapitel er raps nok den bedst undersøgte art. Isozymer på raps har været afprøvet gennem en længere årrække og afprøvning af disse til

sortsadskillelse foregår stadig. Hackenberg og Köhler (1996) har vist, at identifikation indavlede linier var muligt ved hjælp af syv enzymer, hvor især to var velegnet. En anden undersøgelse viste, at et isozym til dels kunne benyttes som identifikation for en del af de sorter, der var undersøgt (Jones et al. 2001). RAPD markører var også velegnet til sortsadskillelse (Mailer et al. 1997, Dulson et al. 1998, Mailer og May 1999, Ma et al. 2000). Udviklingen af SSR-markører i raps er ganske givet et langt stærkere redskab til sortsidentifikation og Tommasini et al. 2003 har vist, at det er muligt. En variant af en PCR- baseret metode kaldet SRAP (sequence-related amplified polymorphism) med anvendelse af udvalgte primere var også velegnet til sortsidentifikation (Riaz et al. 2001). AFLP-markører har ligeledes vist sig nyttige for sortsidentifikation (Lombard et al. 2000, Johannessen et al. 2002, Seyis et al. 2003).

Raps kan skelnes fra nært beslægtede arter ved hjælp af flere metoder f. eks. ved hjælp af isozymer (Diaz et al. 1997) og RAPD-markører (Mailer et al. 1997). Forskel mellem raps og nært beslægtede arter blev også demonstreret med SSR (Plieske og Struss 2001, Varghese et al. 2000). Hybridisering mellem raps og andre arter er også blevet påvist ved hjælp af RAPD markører (Thalman et al. 2001). Specielt for raps er der flere undersøgelser af pollenspredning mellem arter, da det er af afgørende betydning som mulig spredningsvej for økologisk og konventionel dyrkning. Eksempler på pollenspredning mellem GM rapsplanter og ikke modificerede planter er belyst ved hjælp RFLP-markører (Hall et al. 2000) og mellem *Hirschfeldia incana* og raps ved hjælp af herbicid-resistens (Lefol et al. 1996).

Hvidkløver (*Trifolium repens*)

Hvidkløver er en vigtig plante for foder og frøproduktion. Hvidkløver er en overordentlig betydningsfuld plante for det økologiske landbrug, da den anvendes til at tilføje jorden kvælstof (Tolstrup et al. 2003). Den er fremmedbestøvet og insektbestøvet, især honningbier (*Apis mellifera*) er væsentlige bestøvere af hvidkløver, men også andre biarter er af betydning for bestøvningen. En undersøgelse af honningbier og humlebiens evne til at bestøve hvidkløver viste, at der var en høj forekomst af bælg, der havde mere end en pollendonator (Michaelson-Yeates et al. 1997). Undersøgelsen var baseret på analyse af enzymet phosphoglucose isomerase.

Isozymer syntes ikke at have været benyttet til adskillelse af sorter, men RAPD markører var undersøgt for sorter benyttet i USA (Gustine og Huff 1999, Gustine et al. 2002). Forbavsende stor lighed blev fundet mellem sorterne, men sortsadskillelse var mulig. Stor genetisk variation blev fundet indenfor sorterne, men mindre mellem sorterne. Det kunne skyldes differentieret vækst af de individuelle planter, betinget af miljøet (Gustine og Huff 1999). Desuden kan plantens evne til at danne udløbere være en del af forklaringen (Gustine og Sanderson 2001a og b). AFLP-markører var velegnet til skelne mellem sorter (Kölliker et al. 2001).

RAPD markører kunne anvendes til at skelne mellem hvidkløver og alsike kløver (*Trifolium hybridum* L.) (Gustine et al. 2002). Levedygtige hybrider mellem hvidkløver og *Trifolium nigrescens* kan produceres og tilbagekrydsning til hvidkløver ligeledes (Marshall et al. 1995), hybridstatus blev verificeret ved hjælp af isozymer. Ved at benytte mere sofistikerede metoder kan der dannes hybrider mellem hvidkløver og *Trifolium ambiguum*, hvilket kan påvises ved hjælp af AFLP-markører (Abberton et al. 2003). Da *T. nigrescens* og *T. ambiguum* ikke findes vildtvoksende i Danmark, vil disse hybrider ikke forekomme her til lands.

Rødkløver (*Trifolium pratense*)

Rødkløver benyttes lige som hvidkløver til afgræsning og til frøproduktion (Tolstrup et al. 2003). Rødkløver kan anvendes i græsblandinger sammen med hvidkløver. Rødkløver har fremmedbestøvning og kræver insekter til bestøvning fortrinsvis humlebier (*Bombus* spp.), men honningbier (*Apis mellifera*) kan også bestøve rødkløver, afhængigt af blomsterkronens udformning og dermed tilgængeligheden af nektar (Gregor 1976). Sorter og naturlige populationer kunne mere eller mindre klart adskilles ved hjælp af isozymer (Semerikov og Belyaev 1995), og den undersøgelse blev yderligere udbygget til at omfatte 7 naturlige populationer, 7 russiske sorter og 2 sorter fra USA (Semerikov et al. 2002) samt en undersøgelse af amerikanske sorter (Yu et al. 2001). Undersøgelserne gav samme resultat som fundet af Hagen og Hamrick (1998), nemlig at der var mere genetisk variation inden for populationerne end mellem dem. Sidstnævnte forfattere forklarer observationerne som et resultat af blandt andet menneskeskabt frøspredning. RAPD markører var bedre til at skelne mellem sorterne end isozymer (Kongkiatngam et al. 1996,

Campoz- de-Quiroz og Ortega-Klose 2001, Ulloa et al. 2003). AFLP markører var også bedre til identifikation af sorter (Kölliker et al. 2003).

Rødkløver hybridiserer kun vanskeligt med andre arter (Taylor 1990), og der forekommer næppe artshybrider i Danmark.

Sammenfattende for alle arter

Tabel 3 viser en oversigt over forskellige metoder, deres følsomhed og usikkerhed til påvisningen af uønsket frø- eller plantemateriale.

Tabel 3. Påvisning af uønsket materiale i frøparti eller i markafgrøde			
Påvisning af egenskab	Metode	Følsomhed	Usikkerhed
Promoter og indsat gen/gener	PCR baseret DNA metode	Høj	Lille
Indsat gen/gener	PCR baseret DNA metode	Høj	Lille
Genprodukt	Lateral flow stick Kemiske metoder	Høj/middel	Lille
Promoter	PCR baseret DNA metode	Middel	Middel
Promoter og sort	PCR baseret DNA metode	Middel	Middel
Sort	DNA metoder Proteinkemiske metoder	Middel/lav	Middel/høj

Ofte benyttes en bestemt promoter som start på et indsat stykke DNA. Den største sikkerhed i påvisning af GM-frø eller planter fås ved at kombinere påvisning af både promoter og det/de indsatte gen/gener, idet der så specifikt er påvist den genetiske modifikation. Påvisning af det/de indsatte gen/gener giver ligeledes en meget høj sikkerhed i at påvise tilstedeværelsen af GM-materiale, men der skal tages hensyn til, hvilket genmateriale der er anvendt, da det indsatte gen måske findes i planter eller mikroorganismer, der lever samme sted. Påvisning af genprodukt er også en relativ sikker metode, men mangel på udtryk af det indsatte gen er en fejlkilde, som bør inddrages i overvejelserne. Påvisning af promoter alene er også behæftet med en vis usikkerhed, da promoteren kan stamme fra en helt anden modifikation end den der ønskes påvist. Kombinationen af påvisning af promoter og sort kan være en lidt mere sikker detektionsmetode, såfremt der kendes sortsspecifikke markører. Påvisning af sort alene må betegnes som en noget usikker metode, men igen her er det af væsentlig betydning, at der eksisterer et solidt kendskab til sortsspecifikke markører. Af de nævnte metoder er "lateral flow stick" og visse kemiske metoder

(f. eks. sprøjtning med RoundUp, hvis RoundUp resistente planter antages at forekomme i marken) de eneste metoder, der kan udføres på mark eller frølager, og som ikke kræver særlig faglig ekspertise. Disse metoder kan derfor anvendes som en første indikator på evt. forekomst af GM-planter i afgrøden.

Referencer

- Abberton, M. T., Michaelson-Yeates, T. P. T., Bowen, C., Marshall, A. H., Prewer, W., Carlile, E. 2003. Bulked segregant AFLP analysis to identify markers for the introduction of the rhizomatous habit from *Trifolium ambiguum* into *T. repens* (white clover). *Euphytica* 134: 217-222.
- Adam, D., Simonsen, V., Loeschcke, V. 1987. Allozyme variation in rye, *Secale cereale* L .2. Commercial varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 74: 560-565.
- Axelsen, N. H., Krøll, J., Weeke, B. 1973. A manual of quantitative immunoelectrophoresis: Methods and applications. Universitetsforlaget Oslo, Oslo, 169 pp.
- Bachmann, K. 1994. Molecular markers in plant ecology. *New Phytologist* 126: 403-418.
- Balfourier, F., Charmet, G., Ravel, C. 1998. Genetic differentiation within and between natural populations of perennial and annual ryegrass (*Lolium perenne* and *L. rigidum*). *Heredity* 81: 100-110.
- Balfourier, F., Imbert, C., Charmet, G. 2000. Evidence for phylogeographic structure in *Lolium* species related to the spread of agriculture in Europe. A cpDNA study. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 131-138.
- Campos-de-Quiroz, H., Ortega-Klose, F. 2001. Genetic variability among elite red clover (*Trifolium pratense* L.) parents used in Chile as revealed by RAPD markers. *Euphytica* 122: 61-67.
- Chebotar, S., Roder, M. S., Korzun, V., Borner, A. 2002. Genetic integrity of ex situ genebank collections. *Cellular & Molecular Biology Letters* 7: 437-444.
- Cresswell, A., Hamilton, N. R. S., Roy, A. K., Viegas, B. M. F. 2001. Use of amplified fragment length polymorphism markers to assess genetic diversity of *Lolium* species from Portugal. *Molecular Ecology* 10: 229-241.
- Diaz, O., Gustafsson, M., Astley, D. 1997. Effect of regeneration procedures on genetic diversity in *Brassica napus* and *B. rapa* as estimated by isozyme analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44: 523-532.
- Dietzgen, R. G., Abedina, M., Higgins, C.M., Karunaratne, S., Vickers, J. 1998. Nonradioactive detection of transgenes in plant genomic Southern blots. *Biochemica* 1999/No. 1 19-20.

- Dowling, T. E., Moritz, C., Palmer, J.D., Riesenber, L.H. 1996. 1996. Nucleic acids: Analysis of fragments and restriction sites. I D. M. Hillis, C. Moritz and B. M. Mable (eds.) Molecular systematics, 2nd edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, pp. 249-320.
- Dulson, J., Kott, L. S., Ripley, V. L. 1998. Efficacy of bulked DNA samples for RAPD DNA fingerprinting of genetically complex *Brassica napus* cultivars. *Euphytica* 102: 65-70.
- Fernando, W. M. U., Hayward, M. D., Kearsey, M. J. 1997. Isozyme and quantitative traits polymorphisms in European provenances of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L). *Euphytica* 93: 263-269.
- Ghariani, S., Trifi-Farah, N., Chakroun, M., Marghali, S., Marrakchi, M. 2003. Genetic diversity in Tunisian perennial ryegrass revealed by ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 809-815.
- Ghesquiere, M., Barre, P., Marhadour, S., Kerlan, M. C. 2000. Estimation of introgression rate of a fescue isozymic marker into tetraploid Italian ryegrass at early generations of backcross. *Euphytica* 114: 223-231.
- Gilliland, T. J., Coll, R., Calsyn, E., De Loose, M., van Eijk, M. J. T., Roldan-Ruiz, I. 2000. Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties. 1. Morphology and biochemical characterisation. *Molecular Breeding* 6: 569-580.
- Gregor, S. E. 1976. Insect pollination of cultivated crop plants. http://bee.airoot.com/beeculture/book/chap_3.html, 12 pp.
- Griffith, S. M., Banowetz, G. M. 1992. Differentiation of *Lolium perenne* L. and *L. multiflorum* Lam. seed by two esterase isoforms. *Seed Science and Technology* 20: 343-348.
- Gupta, P. K., Varshney, R.K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with the emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185.
- Gustine, D. L., Huff, D. R. 1999. Genetic variation within and among white clover populations from managed permanent pastures of the northeastern USA. *Crop Science* 39: 524-530.
- Gustine, D. L., Sanderson, M. A. 2001. Molecular analysis of white clover population structure in grazed swards during two growing seasons. *Crop Science* 41: 1143-1149.

- Gustine, D. L., Sanderson, M. A. 2001. Quantifying spatial and temporal genotypic changes in white clover populations by RAPD technology. *Crop Science* 41: 143-148.
- Gustine, D. L., Voigt, P. W., Brummer, E. C., Papadopoulos, Y. A. 2002. Genetic variation of RAPD markers for North American white clover collections and cultivars. *Crop Science* 42: 343-347.
- Guthridge, K. M., Dupal, M. P., Kolliker, R., Jones, E. S., Smith, K. F., Forster, J. W. 2001. AFLP analysis of genetic diversity within and between populations of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Euphytica* 122: 191-201.
- Hackenberg, E. M., Kohler, W. 1996. Use of isozyme analysis in the breeding of synthetic rapeseed cultivars. *Plant Breeding* 115: 474-479.
- Hagen, M. J., Hamrick, J. L. 1998. Genetic variation and population genetic structure in *Trifolium pratense*. *Journal of Heredity* 89: 178-181.
- Hails, R. S., Rees, M., Kohn, D.D., Crawley, M.J. 1997. Burial and seed survival in *Brassica napus* subsp. *oleifera* and *Sinapis arvensis* including a comparison of transgenic and non-transgenic lines of the crop. *Proceedings of the Royal Society, London, B* 264: 1-7.
- Hall, L., Topinka, K., Huffman, J., Davis, L., Good, A. 2000. Pollen flow between herbicide-resistant *Brassica napus* is the cause of multiple-resistant *B. napus* volunteers. *Weed Science* 48: 688-694.
- Hegde, S. G., Valkoun, J., Waines, J. G. 2002. Genetic diversity in wild and weedy *Aegilops*, *Amblyopyrum*, and *Secale* species - A preliminary survey. *Crop Science* 42: 608-614.
- Iqbal, M. J., Rayburn, A. L. 1994. Stability of RAPD markers for determining cultivar specific DNA profiles in rye (*Secale cereale* L.). *Euphytica* 75: 215-220.
- Johannessen, M. M., Mikkelsen, T. N., Jorgensen, R. B. 2002. CO2 exploitation and genetic diversity in winter varieties of oilseed rape (*Brassica napus*); varieties of tomorrow. *Euphytica* 128: 75-86.
- Jones, E. S., Dupal, M. P., Kolliker, R., Drayton, M. C., Forster, J. W. 2001. Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 102: 405-415.

- Jones, H., White, J., Ingram, C. J., Solanki, P. D. 2001. Using isoelectric focusing of isozymes of acid phosphatase as a measure of hybrid purity in *Brassica napus* L. *Plant Varieties and Seeds* 14: 53-65.
- Jones, N., Ougham, H., Thomas, H. 1997. Markers and mapping: We are all geneticists now. *New Phytologist* 137: 165-177.
- Jørgensen, R. B., Chen, B.Y., Cheng, B.F., Heneen, W.K., Simonsen, V. 1996. Random amplified polymorphic DNA markers of the *Brassica alboglabra* chromosome of a *B. campestris-alboglabra* addition line. *Chromosome Research* 4: 111-114.
- Jørgensen, R. B., Andersen, B., Hauser, T. P., Landbo, L., Mikkelsen, T. R., Østergård, H., 1998. Introgression of crop genes from oilseed rape (*Brassica napus*) to related wild species - an avenue for the escape of engineered genes. In Thomas, G. and Monteiro, A. A. (eds.), *International Symposium Brassica, Xth Crucifer Genetics Workshop*. ISHS Acta Horticulturae, Rennes, vol. 459, pp. 211-217.
- Kelly, T. J., Jr., Smith, H.O. 1970. A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. II. Base sequence of the recognition site. *Journal of Molecular Biology* 51: 393-400.
- Khavkin, E. E., Zabrodina, M. V., Silis, D. Y. 1996. Isoenzymes of aspartate aminotransferase in perennial and annual rye and their hybrids. *Genome* 39: 513-519.
- Kolliker, R., Herrmann, D., Boller, B., Widmer, F. 2003. Swiss Mattenklee landraces, a distinct and diverse genetic resource of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 107: 306-315.
- Kolliker, R., Jones, E. S., Jahufer, M. Z. Z., Forster, J. W. 2001. Bulked AFLP analysis for the assessment of genetic diversity in white clover (*Trifolium repens* L.). *Euphytica* 121: 305-315.
- Kolliker, R., Stadelmann, F. J., Reidy, B., Nosberger, J. 1999. Genetic variability of forage grass cultivars: A comparison of *Festuca pratensis* Huds., *Lolium perenne* L., and *Dactylis glomerata* L. *Euphytica* 106: 261-270.
- Kongkiatngam, P., Waterway, M. J., Coulman, B. E., Fortin, M. G. 1996. Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA. *Euphytica* 89: 355-361.

- Kota, R., Holton, T.A., Henry, R.J. 1999. Detection of transgenes in crop plantes using molecular beacon assays. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 363-370.
- Kubik, C., Sawkins, M., Meyer, W. A., Gaut, B. S. 2001. Genetic diversity in seven perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars based on SSR markers. *Crop Science* 41: 1565-1572.
- Lefol, E., Fleury, A., Darmency, H. 1996. Gene dispersal from transgenic crops .2. Hybridization between oilseed rape and the wild heavy mustard. *Sexual Plant Reproduction* 9: 189-196.
- Lombard, V., Baril, C. P., Dubreuil, P., Blouet, F., Zhang, D. 2000. Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP: Consequences for varietal registration. *Crop Science* 40: 1417-1425.
- Loos, B. P. 1994. Allozyme differentiation of European populations and cultivars of *Lolium perenne* L., and the relation toecogeographical factors. *Euphytica* 80: 49-57.
- Ma, C. Z., Kimura, Y., Fujimoto, H., Sakai, T., Imamura, J., Fu, T. D. 2000. Genetic diversity of Chinese and Japanese rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties detected by RAPD markers. *Breeding Science* 50: 257-265.
- Mailer, R. J., May, C. E. 1999. Heterogeneity of random amplified polymorphic DNA sequences in individual seedlings and bulked samples of four cultivars of *Brassica napus*. *Plant Breeding* 118: 465-470.
- Mailer, R. J., Wratten, N., Vonarx, M. 1997. Genetic diversity amongst Australian canola cultivars determined by randomly amplified polymorphic DNA. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 37: 793-800.
- Marshall, A. H., Michaelsonyeates, T. P. T., Aluka, P., Meredith, M. 1995. Reproductive characters of interspecific hybrids between *Trifolium repens* L. and *T. nigrescens* Viv. *Heredity* 74: 136-145.
- Matos, M., Pinto-Carnide, O., Benito, C. 2001. Phylogenetic relationships among Portuguese rye based on isozyme, RAPD and ISSR markers. *Hereditas* 134: 229-236.
- MichaelsonYeates, T. P. T., Marshall, A. H., Williams, I. H., Carreck, N. L., Simpkins, J. R. 1997. The use of isoenzyme markers to determine pollen flow and seed paternity mediated by *Apis*

- mellifera* and *Bombus* spp. in *Trifolium repens*, a self-incompatible plant species. *Journal of Apicultural Research* 36: 57-62.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Ehrlich, H. 1986. Specific amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology* 51: 263-273.
- Oliveira, J. A., Balfourier, F., Charmet, G., Arbones, E. 1997. Isozyme polymorphism in a collection of Spanish and French perennial ryegrass populations. *Agronomie* 17: 335-342.
- Oliveira, J. A., Lindner, R., Bregu, R., Garcia, A., Gonzalez, A. 1997. Genetic diversity of westerwold ryegrass landraces collected in Northwest Spain. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44: 479-487.
- Pasakinskiene, I., Griffiths, C. M., Bettany, A. J. E., Paplauskiene, V., Humphreys, M. W. 2000. Anchored simple-sequence repeats as primers to generate species-specific DNA markers in *Lolium* and *Festuca* grasses. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 384-390.
- Persson, K., Diaz, O., von Bothmer, R. 2001. Extent and patterns of RAPD variation in landraces and cultivars of rye (*Secale cereale* L.) from Northern Europe. *Hereditas* 134: 237-243.
- Persson, K., von Bothmer, R. 2000. Assessing the allozyme variation in cultivars and Swedish landraces of rye (*Secale cereale* L.). *Hereditas* 132: 7-17.
- Persson, K., Von Bothmer, R. 2002. Genetic diversity amongst landraces of rye (*Secale cereale* L.) from northern Europe. *Hereditas* 136: 29-38.
- Plieske, J., Struss, D. 2001. Microsatellite markers for genome analysis in Brassica. I. development in *Brassica napus* and abundance in *Brassicaceae* species. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 689-694.
- Ramirez, L., Pisabarro, G. 1985. Isozyme electrophoretic patterns as a tool to characterize and classify rye (*Secale cereale* L.) seed samples. *Euphytica* 34: 793-799.
- Ramirez, L., Pisabarro, G., Delavega, M. P. 1985. Isozyme genetic similarity among rye (*Secale cereale* L.) cultivars. *Journal of Agricultural Science* 105: 495-500.

- Riaz, A., Li, G., Quresh, Z., Swati, M. S., Quiros, C. F. 2001. Genetic diversity of *oilseed Brassica napus* inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance. *Plant Breeding* 120: 411-415.
- Roldan-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliland, T. J., Coll, R., van Eijk, M. J. T., De Loose, M. 2000. Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties. 2. AFLP characterization. *Molecular Breeding* 6: 593-602.
- Roldan-Ruiz, I., van Eeuwijk, F. A., Gilliland, T. J., Dubreuil, P., Dillmann, C., Lallemand, J., De Loose, M., Baril, C. P. 2001. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 1138-1150.
- Semerikov, V. L., Belyaev, A. Y. 1995. Allozyme polymorphism in natural populations and cultivars of red clover *Trifolium pratense* L. *Genetika* 31: 815-819.
- Semerikov, V. L., Belyaev, A. Y., Lascoux, M. 2002. The origin of Russian cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) and their genetic relationships to wild populations in the Urals. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 127-132.
- Seyis, F., Snowdon, R. J., Luhs, W., Friedt, W. 2003. Molecular characterization of novel resynthesized rapeseed (*Brassica napus*) lines and analysis of their genetic diversity in comparison with spring rapeseed cultivars. *Plant Breeding* 122: 473-478.
- Siffelova, G., Pavelkova, M., Klabouchova, A., Wiesner, I., Nasinec, V., Nasinec, I. 1998. RAPD fingerprinting of diploid *Lolium perenne* x hexaploid *Festuca arundinacea* hybrid genomes. *Biologia Plantarum* 40: 183-192.
- Smith, H. O., Wilcox, K.W. 1970. A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *Journal of Molecular Biology* 51: 379-391.
- Srb, A. M., Owen, R.D., Edgar, R.S. 1965. General genetics, 2nd edition. W.H.Freeman and Co., San Francisco, 557 pp.
- Taylor, N. L., 1990. The true clovers. I Janick, J. and Simon, J. E. (eds.), *Advances in new crops*. Timber Press, Portland, vol. pp. 177-182.

- Thalmann, C., Guadagnuolo, R., Felber, F. 2001. Search for spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.) in agricultural zones and evaluation of the genetic diversity of the wild species. *Botanica Helvetica* 111: 107-119.
- Tolstrup, K., Bode Andersen, S., Boelt, B. Buus, M., Gylling, M., Bach Holm, P., Kjellsson, G., Pedersen, S., Mikkelsen, S.A. 2003. Report from the Danish working group on the co-existence of genetically modified crops with conventional and organic crops. DIAS report Plant Production No. 94, November 2003, 275 pp.
- Tommasini, L., Batley, J., Arnold, G. M., Cooke, R. J., Donini, P., Lee, D., Law, J. R., Lowe, C., Moule, C., Trick, M., Edwards, K. J. 2003. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1091-1101.
- Ulloa, O., Ortega, F., Campos, H. 2003. Analysis of genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) breeding populations as revealed by RAPD genetic markers. *Genome* 46: 529-535.
- Varghese, J. P., Rudolph, B., Uzunova, M. I., Ecke, W. 2000. Use of 5'-anchored primers for the enhanced recovery of specific microsatellite markers in *Brassica napus* L. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 115-119.
- Wang, J. P., Bughrara, S. S., Sleper, D. A. 2003. Genome introgression of *Festuca mairei* into *Lolium perenne* detected by SSR and RAPD markers. *Crop Science* 43: 2154-2161.
- Warwick, S. I., Simard, M.-J., Légère, A., Beckie, H.J., Braun, L., Zhu, B., Mason, P., Séguin-Swartz, G., Stewart, C.N. 2003. Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.) O.E. Schultz. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 528-539.
- Werman, S. D., Springer, M.S., Britten, R.J. 1996. Nucleic acids I: DNA-DNA hybridization. I D. M. Hillis, Moritz, C., Mable, B.M. (eds.) *Molecular systematics*, 2nd edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, pp. 169-203.
- Yamada, T., Kishida, T. 2003. Genetic analysis of forage grasses based on heterologous RFLP markers detected by rice cDNAs. *Plant Breeding* 122: 57-60.

Ylstra, B., McCormick, S. 1999. Analysis of mRNA stabilities during pollen development and in BY2 cells. *The Plant Journal* 20: 101-108.

Yu, J., Mosjidis, J. A., Klingler, K. A., Woods, F. M. 2001. Isozyme diversity in North American cultivated red clover. *Crop Science* 41: 1625-1628.