

dann allerdings marginalen Reduktion des GV-Gehaltes führte. Bei Feldern, bei denen eine Auskreuzung bis in größere Felddiefen nachgewiesen werden konnte, war die Reduktion allerdings relativ gering.

Als Fazit der Versuche lässt sich festhalten, dass (i) die separate Randstreifenenernte im NGV-Maisschlag in Verbindung mit anderen pflanzenbaulichen Maßnahmen (z. B. Feldabstand) eine wirkungsvolle Koexistenzmaßnahme sein kann, während (ii) die Wirksamkeit einer Mantelsaat im GV-Maisschlag in Verbindung mit einem Feldabstand zum NGV-Schlag bisher nicht belegt werden konnte.

40-4 - Bückmann, H.; Kobbe, C.; Hüsken, A.
Julius Kühn-Institut

Eignung des Anbaus von cytoplasmatisch männlich sterilem (CMS) Mais als biologische Confinement-Methode zur Reduzierung der Pollenverbreitung

Suitability of cytoplasmatic male sterile (CMS) maize cultivation as a biological confinement-method to reduce pollen emission

Für die biologische Sicherheit nutzungsveränderter transgener Pflanzen, die z. B. pharmazeutische Wirkstoffe (PMPs), Industrierohstoffe (PMIs), funktionelle Inhaltsstoffe (Functional Food) oder Bioenergie produzieren, ist die Reduzierung einer möglichen unerwünschten Verbreitung (biologisches Confinement) von zentraler Bedeutung. Erforderlich für die Nutzung biologischer Confinement-Methoden sind eine hohe Merkmalstabilität der Gene und Kenntnisse über die Zuverlässigkeit dieser Methoden in verschiedenen Umwelten.

Cytoplasmatisch männlich steriler Mais (CMS) als biologische Confinement-Methode beruht auf der Tatsache, dass die männliche Blüte auf natürliche Weise keinen befruchtungsfähigen Pollen bildet. Diese Eigenschaft wird maternal vererbt, ist aber reversibel in Gegenwart eines oder mehrerer sogenannter Restorer-Gene (Rf-Gene). Diese Gene basieren auf dem Cytoplasma-Typ (CMS-T, CMS-S und CMS-C) und können die Fertilität ganz oder teilweise restaurieren. Die Pflanzen bilden dann fertile oder fluktuierende Rispen mit unterschiedlichen Mengen an befruchtungsfähigem Pollen aus. Desweiteren können auch Umwelteinflüsse wie Starkregen und extreme Hitze die Sterilität aufheben.

Ziel des hier vorgestellten Projektes ist die Prüfung der umweltabhängigen Zuverlässigkeit von CMS-Mais als biologische Confinement-Methode. Die Untersuchungen sollen dazu beitragen, Empfehlungen für den Anbau von nutzungsveränderten Pflanzen zu geben. Im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes „Optimierung der biologischen Sicherheit gentechnisch veränderter Pflanzen“ wurden im Jahr 2009 Feldversuche in drei Umwelten (Braunschweig, Freising, Groß Lüsewitz) unter praxisüblicher Bewirtschaftung durchgeführt und in Hauptwindrichtung angelegt. Aus einem Vorversuch in 2008 wurden drei geeignete CMS-Maishybriden (DSP2: CMS-T, 'Torres' und 'Zidane': CMS-S) ausgewählt und im Vergleich zur konventionellen Hybride 'Delitop' getestet. Alle Hybriden entwickeln gelbe Körner. Weißmais (DSP 17007) diente als Pollenempfänger. Zwischen CMS-Mais- und Weißmaisparzellen (je 48 x 69 m) lag ein Bearbeitungstreifen von 3,5 m. Als natürliche Pollenbarriere zwischen den Prüfeinheiten wurde Hanf angebaut. An definierten Bonitur- und Erntepunkten wurde folgendes untersucht: Blüte der CMS-Maishybriden (steril, fluktuierend, fertil), Pollenvitalität durch Selbstung und Mean Kernel Sets (MKS = Anteil Körner je Spindel), Auskreuzungspotential (Anzahl gelber Körner im Weißmais), Reduzierung der Auskreuzung.

Keine der geprüften CMS-Hybriden war im Versuchsjahr 2009 100 % steril. Die CMS-Hybride DSP2 reagierte stark standortabhängig. In Braunschweig bildete sie überwiegend sterile Rispen an den Boniturstellen aus. Im Gesamtbestand traten aber immer wieder fertile Rispen mit viel Pollen auf. In Groß Lüsewitz wurden überwiegend fluktuierende Rispen mit wenig Pollen bonitiert. Die höchste Vitalität der Pollen wurde in Freising (MKS 81 %) gemessen. In Groß Lüsewitz wurden 40 % MKS entwickelt und in Braunschweig < 1 %. 'Torres' bildete an allen Standorten fluktuierende Rispen mit wenig Pollen, deren Vitalität gering war (MKS < 1 %). Zidane entwickelte erwartungsgemäß fluktuierende bis fertile Rispen mit vitalem Pollen (MKS 20 bis 40 %). Die Zeiträume der männlichen CMS-Maisblüte und der weiblichen Weißmais-Blüte verliefen parallel. Blühsynchronität und Befruchtung waren demnach sichergestellt. An jedem Standort erfolgte die höchste Auskreuzung aller Prüfglieder in der ersten Reihe des Pollenempfängers, d. h. nach 3,5 m. Bereits nach 6,50 m trat eine starke Auskreuzungsreduktion auf, die sich mit zunehmender Entfernung zur CMS-Mais-Parzelle weiter verringerte. Nach 30 m waren alle Werte < 1 %. An den drei Standorten wurde im Mittel der ersten 30 m die Auskreuzung aller CMS-Maishybriden um 84 % bis 97 % im Vergleich zur 'Delitop' reduziert. 'Torres' wies eine Reduktion von mittleren 96,5 % auf. In Braunschweig wurden sogar 98 % erreicht. DSP2 bewirkte eine Auskreuzungsreduktion von ca. 84,2 %, wobei in Braunschweig 91,7 % berechnet wurden und in Freising nur 77 %. 'Zidane' bewirkte eine Auskreuzungsreduktion um mittlere 83,7 %, die höchste am Standort Groß Lüsewitz (89,5 %).

Die 2009 geprüften CMS-Maishybriden stellen (mit Einschränkungen) ein geeignetes Instrument zur Auskreuzungskontrolle dar. Für die Nutzung als Confinement-Methode, beim Anbau von PMPs und PMIs sollten sie mit anderen Confinement-Methoden wie z. B. geringe Isolationsabstände, Mantelsaaten aus Mais oder Hanf, kombiniert werden.

40-5 - Dowideit, K.; Hüsken, A.
Julius Kühn-Institut

Kleistogamer Raps als biologische Confinement-Strategie – Kann eine Auskreuzung über den Pollen unterbunden werden?

Cleistogamous oilseed rape as a biological confinement strategy – Is it possible to prevent out-crossing through pollen?

Beim Anbau von Raps (*Brassica napus* L.) können Rapspollen durch Wind und Insekten auch über weite Distanzen transportiert werden. Das daraus resultierende hohe Auskreuzungspotential könnte bei der Kultivierung von gentechnisch verändertem Raps zu einer Verbreitung von neu eingeführten Genen führen. Um den ungewollten Pollenfluss zu unterbinden und eine Auskreuzung während des Anbaus von transgenem Raps einzuschränken, soll die Eigenschaft der Kleistogamie (Selbstbestäubung in geschlossenen Blüten) als mögliche biologische Confinement-Strategie beim Raps untersucht werden. Kleistogamie kommt beim Raps natürlicherweise nicht vor. Im INRA (National Institute for Agronomic Research, Rennes) wurde jedoch durch chemisch induzierte Mutation ein kleistogamer Rapsgenotyp erzeugt und patentiert. Diese Rapslinie weist einen durchschnittlichen Anteil von 94 % geschlossenen Blüten auf (Leflon et al, 2010).

In Feldversuchen sollen nun Erkenntnisse über die Merkmalsstabilität kleistogamer Rapslinien in unterschiedlichen Umwelten gewonnen und die Zuverlässigkeit kleistogamer Rapslinien als biologische Confinement-Methode überprüft werden. Im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes „Entwicklung und Überprüfung von Confinement-Strategien für Raps“ wurden im Jahr 2009 Feldversuche in zwei Umwelten (Braunschweig (BS)-Völkenrode und Hohenheim) unter praxisüblicher Bewirtschaftung durchgeführt. Als Pollenquelle (Donor) wurde ein 0,25 Hektar großes Feld mit kleistogamem Raps (CLG) angebaut, an das in Windrichtung ein 0,25 Hektar großer Schlag mit nicht-kleistogamem Raps der Linie 'Marcant' als Pollenempfänger (Rezipient) angeschlossen war. An beiden Standorten lag eine Blühsynchronität zwischen Donor- und Rezipientenschlag vor. Dadurch war die Möglichkeit für eine Fremdbestäubung und somit eine Auskreuzung von CLG-Pollen in den 'Marcant'-Plot gegeben. Zum Erntezeitpunkt wurden auf beiden Versuchsflächen aus dem Rezipientenfeld ('Marcant') die Haupttriebe offen abgeblühter Rapspflanzen in jeweils 8 unterschiedlichen Distanzen zum Donorfeld (0 m, 3 m, 4,5 m, 6 m, 12,5 m, 25 m, 36 m und 50 m) geerntet, um die Samen für spätere molekularbiologische Untersuchungen zu gewinnen. Der Nachweis soll mittels des im Folgenden beschriebenen PCR-Verfahrens erfolgen.

Der kleistogame Phänotyp wird bedingt durch eine Mutation im Clg-Gen. Es handelt sich um eine Punktmutation, die zu einem Austausch einer Aminosäure in der Proteinsequenz führt (Lu et al. 2009). Die Clg-Mutation kann durch ein in Frankreich patentiertes Nachweisverfahren detektiert werden (Patent-Nr. 2923839), bei dem eine PCR mit einem anschließenden Restriktionsverdau kombiniert wird. Die Unterscheidung zwischen dem mutierten Genotypen (CLG) und dem Wild-Genotypen ('Marcant') beruht darauf, dass durch die Punktmutation im Clg-Gen von CLG eine Restriktionsschnittstelle entsteht. In den Clg-Gensequenzen von 'Marcant' ist diese Schnittstelle nicht vorhanden. Daher können die PCR-Produkte von CLG nach einem Verdau aufgrund des Längenunterschieds von ca. 20 bp im Agarosegel identifiziert werden. Dieses qualitative PCR-Nachweisverfahren soll genutzt werden, um in einem sog. Subsampling Verfahren die Auskreuzungsrate von CLG in den 'Marcant'-Plot zu ermitteln. Da im Versuch im 'Marcant'-Plot mit geringen Auskreuzungsraten gerechnet wird (bedingt durch die reduzierte Pollenemission im CLG-Plot), muss bei der Anwendung dieser Methode gewährleistet sein, dass auch in Samenproben mit einem geringen Anteil an ausgekreuzten Samen und somit einer geringen Anzahl an Clg-Genkopien aus CLG eine eindeutige Detektion möglich ist. Eine Anpassung der Methode und Bestimmung von Nachweisgrenzen ist daher genauso erforderlich wie die Erstellung von geeigneten Prüfplänen für das Subsampling Verfahren.

Literatur

- [1] Leflon, M., Hüsken, A., Njontie, C., Kightley, S., Pendergrast, D., Pierre, J., Renard, M., Pinochet, X. (2010) Stability of the cleistogamous trait during the flowering period of oilseed rape. *Plant Breeding* 129: 13-18.
- [2] Lu, Y. H.; Delourme, R.; Chalhoub, B.; Piel, N.; Falentin, C.; Renard, M.; Belcram, H. (2009) Producing a cleistogamous plant comprises inhibiting expression of the Clg1 gene. Patent FR 2923839.