

We investigated the role of *M. truncatula* small GTPase MtROP9 (*M. truncatula* Rho of plants) via an RNA interference silencing approach. RAC/ROP proteins are small GTP binding proteins which functions as molecular switches in the cellular signal transduction pathways, including regulation of reactive oxygen species (ROS) early infection phases via activation of NADPH oxidase homologs of plants termed as RBOH (for respiratory burst oxidase homolog). Composite plants (MtROP9i) with roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* carrying the RNA interference vector were generated and infected accordingly.

The MtROP9i lines showed a clear reduction on growth phenotype and revealed neither ROS generation nor MtROP9 and MtRBOH gene expression after the infection. The induction of antioxidative compounds was not realized in MtROP9i roots as indicated by differential proteomics (2-Dimensional gel electrophoresis). Furthermore, MtROP9i knockdown clearly promoted mycorrhizal and *A. euteiches* early hyphal root colonization while rhizobial infection was clearly impaired. The infected MtROP9i roots showed parts of extremely swollen noninfected root hairs and reduced numbers of deformed nodules. *S. meliloti* nodulation factor treatments of MtROP9i resulted in deformed root hairs showing progressed swelling of its upper regions or even of the entire root hair and spontaneous constrictions but reduced branching effects occurring only at swollen root hairs. These results suggest a key role of Rac1 GTPase MtROP9 in ROS-mediated early infection signaling.

In our on-going proteomic analyses, proteins regulated upon infection shows differential protein patterns for the observed period after post inoculation with majority of proteins identified in vector control than in MtROP9-deficient plants. Mass spectrometry analyses being carried out clearly shows the identity of these regulated proteins in the plant cells both for symbiotic and pathogenic infections.

123-Langhof, M.; Rühl, G.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsanstalt für Kulturpflanzen

Pollenvermittelter Genfluss bei Mais: Reduzierung der Auskreuzung durch Anlage einer Mantelsaat

Pollen-mediated gene flow in maize: Efficacy of border rows in reducing outcrossing

Im Rahmen eines mehrjährigen Forschungsprojektes finden am Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde des Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsanstalt für Kulturpflanzen (JKI) Feldversuche unter praxisnahen Bedingungen statt, um pflanzenbauliche Maßnahmen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zur Reduktion der Auskreuzung von gentechnisch verändertem (GV) Mais in benachbarte konventionelle Maisbestände zu bewerten. Neben Mindestabständen, Pufferflächen, separater Randstreifenerte oder zeitlich versetzten Saatterminen ist die Anlage einer Mantelsaat aus konventionellem Mais an der Feldkante des GV-Maisfeldes, die dem konventionellen Schlag gegenüberliegt, eine weitere vielfach diskutierte Maßnahme zur Reduzierung des pollenvermittelten Genflusses. Einer Mantelsaat werden zwei auskreuzungsreduzierende Funktionen zugeschrieben; erstens kann sie aufgrund ihrer räumlichen Ausdehnung als physikalische Barriere für den Pollenflug wirken und zweitens verdünnt sie durch Schüttung eigenen Pollens den Eintrag von GV-Pollen. Diese Maßnahme wurde bereits von einigen EU-Mitgliedsstaaten in ihre nationalen Koexistenzregelungen aufgenommen. Allerdings ist die Wirksamkeit von Mantelsaaten bisher noch nicht durch detaillierte wissenschaftliche Feldversuche belegt worden. Daher prüfen wir in großflächigen, praxisnahen Feldversuchsanlagen die Effektivität von 9 und 18 m breiten Mais-Mantelsaaten in Kombination mit verschiedenen Mindestabständen zwischen GV- und konventionellem Maisfeld. Im Jahr 2008 haben wir an drei deutschen Standorten Mantelsaaten mit einem Mindestabstand von 51 m kombiniert. Es wurden GV-Gehalte von Körnerproben aus verschiedenen Feldtiefen des konventionellen Empfängerschlaages mittels quantitativer PCR bestimmt und der GV-Gehalt der gesamten Ernte des Schlaages berechnet. An keinem der drei Standorte führte die 9 m oder 18 m breite Mantelsaat im Vergleich zur Variante ohne Mantelsaat zu einer Reduktion der Auskreuzungsrate. Daraufhin haben wir das Versuchsdesign modifiziert, um die Anlage einer Mantelsaat als mögliche Koexistenzmaßnahme für kleinstrukturierte Agrarräume bewerten zu können. Dafür wurden die Mindestabstände zwischen Donor- und Empfängermais-schlag auf 6 bzw. 12 m reduziert. In diesen von 2010 bis 2012 durchgeführten Versuchen wurde aufgrund des nationalen Anbauverbots von GV-Mais ein GV-freies, auf der unterschiedlichen Kornfarbe von Donor- und Empfängermais basierendes Testsystem verwendet. Als Donor diente die gelbkörnige Sorte 'Delitop' und als Empfänger die weißkörnige Sorte 'DSP 17007'. Die gelbe Kornfarbe ist dominant gegenüber der weißen, so dass sich die Auskreuzungsrate visuell durch Auszählung ermitteln lässt. Die Auskreuzungsrate in der Gesamternte des Empfängerschlaages wurde auf der Basis einer großen Menge an im Schlag verteilten Erntepunkten berechnet. Die Ergebnisse der bisher ausgewerteten ersten beiden Versuchsjahre 2010 und 2011 sind konträr. 2010 wurde nur bei einem Mindestabstand von 6 m zwischen Donor- und Empfängermaisfeld eine Reduktion der Auskreuzung durch die Anlage einer 9 oder 18 m breiten Mantelsaat festgestellt. Bei einem Mindestabstand von 12 m dagegen war kein Effekt erkennbar; die Variante mit einer 18 m breiten Mantelsaat wies sogar eine höhere Auskreuzungsrate als die Kontrollvariante auf. Im Jahr 2011 hingegen führte nur die Variante mit einer 12 m

breiten Mantelsaat zu reduzierten Auskreuzungsraten, wohingegen die 6 m-Variante ohne erkennbaren Effekt blieb.

Als Schlussfolgerung lässt sich festhalten, dass die Anlage einer 9 oder 18 m breiten Mais-Mantelsaat keine verlässliche Koexistenzmaßnahme darstellt, zumindest nicht in Kombination mit Mindestabständen von 6, 12 oder 51 m. Die Ergebnisse unseres langjährigen Forschungsprojektes zeigen, dass die separate Ernte der dem GV-Maisschlag gegenüberliegenden Feldkante des konventionellen Maisschlags eine effizientere und zuverlässigere Maßnahme zur Reduzierung der Auskreuzungsrate ist (Langhof et al., 2011).

Literatur

LANGHOF, M., HOMMEL, B., HÜSKEN, A., MASTEL, K., SCHIEMANN, J., WEHLING, P., RÜHL, G., 2011: Coexistence in maize: Effect on pollen-mediated gene flow by conventional maize border rows edging genetically modified maize fields. *Crop Science* 50:1496 - 1508.

124-Bückmann, H.¹⁾; Hüskén, A.²⁾

¹⁾ Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

²⁾ Max Rubner-Institut

Eignung der cytoplasmatischen männlichen Sterilität (CMS) als biologische Confinement-Methode beim Anbau von Mais

Applicability of the cytoplasmic male sterility (CMS) as a biological confinement-method in maize

Für die biologische Sicherheit transgener Pflanzen ist die Reduzierung einer möglichen unerwünschten Verbreitung (biologisches Confinement) von zentraler Bedeutung. Erforderlich für die Nutzung einer biologischen Confinement-Methode ist eine hohe Merkmalstabilität der Gene. Cytoplasmatisch männlich steriler (CMS) Mais als biologische Confinement-Methode beruht auf der Tatsache, dass die männliche Blüte auf natürliche Weise keinen Pollen bildet. cmS kann durch besondere Gene des Kerngenoms, sog. Rf-Gene, aufgehoben und Pollenfertilität wieder hergestellt werden. Auch besondere Umweltbedingungen spielen hierbei eine Rolle. Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen ist die Prüfung der umweltabhängigen Zuverlässigkeit von cmS-Mais als biologische Confinement-Methode. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, Empfehlungen für den Anbau von transgenem Mais abzuleiten. An drei Standorten (BS: Braunschweig, GL: Groß Lüsewitz, FR: Freising) wurden 2-jährige Feldversuche (2009, 2010) mit 3 cmS-Maishybriden ('DSP2', 'Torres', 'Zidane') und einer konventionellen Maissorte ('Delitop'), alle gelbkörnig, sowie Weißmais (WM: 'DSP 17007') als Pollenempfänger unter praxisnahen Bedingungen in Großparzellen (ca. 3500 m²) durchgeführt. Die Kornfarbe „gelb“ vererbt sich dominant gegenüber „weiß“, wodurch Auskreuzungen als gelbe Körner an WM-Kolben sichtbar werden. Zur Verhinderung eines unerwünschten Polleneintrags wurde ein 18 m breiter Hanfstreifen als natürliche Pollenbarriere zwischen die einzelnen Prüfeinheiten (Pollenspender/-empfänger) gelegt. Untersuchungen an definierten Bonitur- und Erntepunkten: Blüte der cmS-Maishybriden (steril, fluktuierend, fertil), Pollenvitalität durch Selbstung und Mean Kernel Sets (MKS = Anteil Körner je Spindel), Auskreuzung, Reduzierung der Auskreuzung.

Die beiden Versuchsjahre unterschieden sich erheblich voneinander. In 2009 ähnelten Lufttemperaturen und Niederschläge an allen Standorten dem langj. Mittel. 2010 war insgesamt feuchter und kälter, ausgenommen Juli (+3 °C - +3,5 °C). Keine getestete cmS-Mais Hybride war 100 % steril. Dies zeigte sich an der Rispencharakteristik, der Pollenbildung und dem MKS. 'DSP2' reagierte stark auf Umwelteinflüsse (Standort/Jahr). In BS traten überwiegend sterile Rispen auf. In GL und FR differenzierten sie sich von steril (2010) zu fluktuierend (2009) und entwickelten entsprechend keinen, wenig oder viel Pollen. Die höchste cmS-Stabilität bewies Torres. Es wurden umweltunabhängig 95 % - 99 % fluktuierende Rispen mit wenig oder keinem Pollen und MKS von < 1 % bestimmt. Zidane entwickelte fluktuierende und fertile Rispen mit wenig bis viel Pollen, wobei der MKS in 2009 20 % bis 44 % erreichte, in 2010 aber < 6,9 % lag. An allen Standorten wurden 2009 deutlich höhere Auskreuzungsraten ermittelt als 2010. Es traten allorts die höchsten Werte für 'DSP2' auf (Parzellenmittel: 1,0 % - 1,8 %), die niedrigsten für 'Torres' (< 0,2 %). Mit zunehmender Entfernung vom Pollenspender nahmen die Auskreuzungen stark ab. 'DSP2' in BS: von 12,6 % (1. Reihe, 3,5 m) zu 1,4 % bei 6,5 m und < 1 % bei 11 m. Ähnliches wurde in FR und GL sowie für 'Zidane' ermittelt. Diese Ergebnisse bestätigten sich 2010 auf niedrigerem Niveau. Im Abstand von 6,5 m bis 10 m zu den cmS-Mais-Parzellen lagen die Auskreuzungsraten in beiden Jahren durchweg < 1 %. Die Auskreuzung wurde am homozygoten Merkmal „Kornfarbe“ untersucht. Unter der Annahme, es handelte sich um eine transgene Eigenschaft (z. B. Bt), erfolgte die Auskreuzung hemizygot und die ermittelten Werte wären zu halbieren. Die Auskreuzungsraten wären damit deutlich geringer. In Relation zur vollständig fertilen Maishybride 'Delitop' (100 %) bewirkten die cmS-Maishybriden eine starke Auskreuzungsreduktion, die innerhalb der ersten 30 m jeder WM-Parzelle für 'Torres' bei durchschnittlich 96,5 % (2009) bzw. 88,9 % (2010), für 'Zidane' bei 83,7 % (2009) bzw. 84,4 % (2010) und für 'DSP2' bei 84,2 % (2009) bzw. 89,9 % (2010) lag. Die geprüften cmS-Maishybriden stellen (mit Einschränkungen) ein geeignetes Instrument zur Auskreuzungskontrolle dar. Als Confinement-Methode beim Anbau von GV-Mais