

In-vivo-Induktion von Haploiden - praktische Anwendung in der Linienentwicklung und rekurrenten Selektion bei Mais

J. EDER und S. CHALYK

1. Einleitung

Die Entwicklung homozygoter Linien ist ein wesentlicher Bestandteil eines Mais-Zuchtprogrammes. Traditionell werden diese Linien durch 5-6maliges Selbsten von Pflanzen einer heterozygoten Züchtungspopulation erzeugt.

Das Verfahren der Produktion von homozygoten Linien über maternale Haploide wurde entwickelt, ausgehend von der Erkenntnis, dass bestimmte Genotypen, auch als „Inducerlinien“ bezeichnet, meist hervorgegangen aus der Linie Stock 6 (COE 1959), in der Lage sind, haploide Nachkommen entstehen zu lassen, wenn sie als Pollenspender eingesetzt werden. Hinzu kommt, dass traditionelle *in-vitro*-Verfahren zur Produktion von DH-Pflanzen über Antheren- oder Mikrosporenkultur bei Mais bislang nicht erfolgreich eingesetzt werden können (BÜTER 1997). Haploide Maispflanzen sind vital und können durch eine Verdopplung des Chromosomensatzes in homozygote, doppelhaploide Linien (DH-Linien) überführt werden. Für die Identifizierung der in den maternalen Kolben entstehenden haploiden Körner wird ein System dominanter Farbmarker auf der Basis verschiedener Anthozyan-Gene verwendet (NANDA und CHASE 1966, CHASE 1969). Eins der wichtigsten Gene ist hier *R1-nj*, mit dessen Hilfe die Unterscheidung haploider und diploider Körner ermöglicht wird. Die Expression dieses Gens bewirkt eine Anthozyanfärbung des Embryos und des Endosperms. Körner mit pigmentiertem Endosperm und nicht pigmentiertem Embryo werden als Haploide selektiert. Auf diese Weise können maternale Haploide in großer Anzahl erzeugt werden. (TYRNOV und ZAVALISHINA 1984, ZABIROVA et al. 1996, DEIMLING et al. 1997, CHALYK 1999).

Für die Verdopplung des Chromosomensatzes wurden bislang verschiedene

Methoden unter Verwendung von Colchizin (BORDES et al. 1997), anderen die Mitose hemmenden Substanzen wie Trifluralin, Amiprofos-methyl oder Pro-namid (NOTSUKA et al. 2000) oder N₂O bei 600 kPa Druck (KATO 2002) entwickelt.

Nach Ergebnissen von CHALYK und ROTARENCO (1999) ist der Einsatz von Haploiden auch in der rekurrenten Selektion zur Entwicklung neuer Züchtungspopulationen erfolgversprechend.

Der Mechanismus der Haploideninduktion und der Entstehung haploider Embryonen ist bislang weitgehend ungeklärt. Es wird vermutet, dass sich aus dem Pollen von Inducerlinien zwei Kerne mit unterschiedlicher Geschwindigkeit entwickeln und nur einer einen befruchtungsfähigen Zustand erreicht. Eine daraus resultierende ausschließliche Befruchtung des sekundären Embryosackkerns regt auch den nicht befruchteten haploiden Embryo zu einer weiteren Entwicklung an (ENALEEVA et al. 1996).

Um den Einsatz dieser vielversprechenden Technologie in der Maiszüchtung weiter zu entwickeln, wurden einige Versuche zur Effizienz des Verfahrens unter mitteleuropäischen Bedingungen und mit gängigem Zuchtmaterial durchgeführt. Folgende Ziele sind im wesentlichen zu verfolgen, um das Verfahren in Standard-Zuchtprogrammen erfolgversprechend einsetzen zu können:

- Herstellung von Haploiden in ausreichender Anzahl. Vorhandene Inducerlinien sind zu evaluieren und züchterisch zu verbessern.
- Eindeutige Identifizierung der Haploiden. - Markersysteme auf der Basis von Anthozyangen, (z.B. *R1-nj*) oder anderen, müssen zuverlässig und unabhängig von maternalen Genotyp wirksam sein.
- Effiziente Verdopplung des Chromosomensatzes - Nur hohe Aufdoppelungs-

raten und geringe Ausfallquoten machen das System wirtschaftlich.

2. Material und Methoden

Drei Induktionslinien wurden auf ihre Induktionsraten hin getestet. - MHI (*Moldavian Haploid Inducer*) Herkunft: Institute of Genetics, Chisinau Moldawien, - M741H, Herkunft: Maize Genetics Cooperation Stock Center, USDA/ARS, - RWS, Herkunft: Universität Hohenheim.

Die Selektion der Körner mit haploidem Embryo erfolgte über das in den Induktionslinien etablierte Markersystem mit dem Gen *R1-nj*. Die endgültige Identifizierung als Haploide erfolgte an der Pflanze auf der Basis des typischen Habitus und durch das Auszählen der Chromosomen.

Der Effekt des maternalen Genotyps auf die Frequenz der Haploideninduktion wurde an 20 verschiedenen Züchtungspopulationen aus dem mitteleuropäischen Flint- und Dentpool sowie an Flint/Dent-Hybriden ermittelt. Für dieses Experiment wurde als Induktionslinie MHI eingesetzt und während der Selektion der Haploiden die Expression des *R1-nj*-Gens bewertet. Eine weitere Bewertung der Genexpression erfolgte im Jahr 2002 mit Material aus anderen Züchtungspopulationen.

Es wurden zwei Methoden der Chromosomenverdopplung untersucht. Methode I (Hohenheimer Methode) beschrieben bei DEIMLING et al. (1997) und Methode II (Krasnodar-Methode) nach ZABIROVA et al. (1996). Nach Methode I wurden die Keimlinge behandelt, wenn die Koleoptile mindestens 1 cm lang ist. Die Körner wurden bei 26°C 4 Tage gekeimt, die Spitze der Koleoptile abgeschnitten und dann für 12h in eine 0,06% Colchizininlösung mit 0,5% DMSO ge-

Autoren: Dr. Joachim EDER, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Am Gereuth 4, D-85354 FREISING und S. CHALYK, Institut für Genetik, CHISINAU 2002, Padurii 20, Moldawien



ben. Nach der Behandlung wurden die keimenden Körner gewaschen und ausgepflanzt.

Nach Methode II wurden die haploiden Pflanzen bis zum 3-4-Blatt-Stadium herangezogen. Dann wurde mittels einer Injektionsnadel eine 0,125% Colchizinlösung 3-5 mm oberhalb des Vegetationspunktes injiziert. Für die Untersuchungen zur Chromosomenverdoppelung wurden Haploide, die aus der Kreuzung der Linien MK01y x A619 produziert wurden, verwendet. Die Chromosomenverdoppelung wurde als erfolgreich eingestuft, wenn einige Antheren mit fertilem Pollen an der Rispe einer Pflanze gebildet wurden. Die Fertilität des Pollens wurde visuell beurteilt (DEIMLING et al. 1997).

3. Ergebnisse

Die Frequenz der induzierten Haploiden wurde für drei Induktionslinien verglichen, MHI, M741H und RWS. Die Kolben fünf maternaler Genotypen enthielten nach einer Bestäubung mit dem Inducer MHI im Durchschnitt 4,4% haploide Körner. Bei Verwendung von M741H waren es nur 2,2%, während RWS 10,9% erreichte. Ein weiterer untersuchter Faktor war der Einfluss des maternalen Genotyps. Hier konnte ein starker Einfluss festgestellt werden. Mit dem Inducer

MHI konnten Induktionsraten zwischen 2,7 bis 8,0%, je nachdem welcher Herkunft die zu bestäubende Population war, erzielt werden. Die durchschnittliche Rate an Haploiden aus Populationen mit der Abstammung Dent lag bei 5,3%, ähnlich bei Flint x Dent Hybriden. Bei Flints konnten nur etwas niedrigere Werte von 3,6% erzielt werden.

Ebenso festgehalten wurde die Anzahl von Körnern ohne Embryo. Sie lag bei Bestäubung mit MHI bei 2%, bei M741H bei 0,6% und bei RWS bei 4%. Bei den Flints wurden 1,8% der Körner ohne Embryo ausgebildet, bei den Dents und den Hybriden waren es 2,4%.

In der *Tabelle 2* ist die mittlere Bewertung der Ausprägung des Anthozyan-Markergens *R1-nj* sowohl beim Embryo als auch im Endosperm in den im Jahr 2001 untersuchten Züchtungspopulationen dargestellt. Für die Färbung des Embryos ergaben sich Werte zwischen 3 und 4 auf einer Skala zwischen 5 für ausgezeichnete Pigmentierung und 1 für eine vollständige Unterdrückung der Anthozyan-Produktion. In der Färbung des Endosperms gab es keine wesentlichen Unterschiede in Abhängigkeit von der Herkunft des Materials.

Im Jahr 2002 wurde mit anderem Ausgangsmaterial eine weitere Bewertung der Färbung des Embryos durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in *Tabelle 3* dargestellt. Bei den 45 Herkünften aus dem Dent-Pool war insgesamt eine zufriedenstellende Ausprägung, die eine zuverlässige Selektion ermöglichte, festzustellen. Die Farbausprägung bei den Flints war deutlich schlechter, etwa bei der Hälfte der Herkünfte waren die Haploiden aufgrund mangelnder Pigmentierung nicht eindeutig selektierbar.

Einer der wesentlichen Vorzüge des Einsatzes doppelhaploider Pflanzen in der Maiszüchtung ist die Beschleunigung der Produktion von homozygoten Linien. Diese erhält man nach einer Verdoppelung des Chromosomensatzes und anschließender Selbstung. Die Chromosomenverdoppelung erfolgt bislang meist durch den Einsatz von Colchizin. In der *Tabelle 4* wird die Effizienz zweier verschiedener Methoden zur Applizierung von Colchizin verglichen. Methode I, die Behandlung des Keimlings, erzielte gute Resultate: 49,9% der Haploiden hatten fertile Pollen, 39,0% konnten geselbstet werden und aus 27,3% aller als haploid selektierten Körner konnten schließlich doppelhaploide Linien produziert werden. Bei Methode II, der Injektion von Colchizin in die Pflanze, konnten, obwohl 88,6% der selektierten Haploiden vital waren, nur 16% aufgedoppelt werden und somit nur aus 8,1% DH-Linien entwickelt werden, weniger als ein Drittel der Menge mit Methode I. In der Kontrollgruppe ohne Behandlung waren fast alle Pflanzen steril. Von 3 Pflanzen, die Pollen produzierten, konnte eine geselbstet werden, es gab keinen Samenansatz.

4. Diskussion

Die Methode maternale Haploide durch den Einsatz von Inducerlinien zu erzeugen bietet neue Möglichkeiten zu einer effizienten Gestaltung von Maiszüchtungsprogrammen. Die Anzahl erzeugter DH-Linien ist abhängig von der Induktionsrate der eingesetzten Linie, vom maternalen Genotyp sowohl hinsichtlich der Frequenz der Haploiden als auch der Möglichkeit der Identifizierung, und letztendlich von der Anzahl erfolgreich verdoppelter Chromosomensätze.

Der Einsatz einer Induktionslinie mit einer hohen Induktionsfrequenz ist ein erster Schritt. Die untersuchten Linien unterscheiden sich hier erheblich (von 2,2%

Tabelle 1: Der Prozentanteil (mit Standardabweichung) von Körnern mit haploidem Embryo und ohne Embryo erzeugt mit verschiedenen Inducerlinien und bei verschiedenem genetischem Hintergrund des Ausgangsmaterials

Frequency of haploid plants (Freising 2001)	Seeds total	haploid %	embryoless %
Inducers			
MHI	4251	4,4± 0,3	2,0 ± 0,2
M741H	1712	2,2 ± 0,4	0,6 ± 0,2
RWS	716	10,9± 0,5	3,8 ± 0,2
Maternal Genotypes (MHI)			
European Flints	7004	3,6 ± 0,2	1,8 ± 0,2
Dents	22173	5,3 ± 0,2	2,4 ± 0,1
Hybrids (flint x dent)	9627	4,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1

Tabelle 2: Die Ausprägung des Gens *R1-nj* bei verschiedenem genetischem Hintergrund des maternalen Genotyps, Freising, 2001

Genotypes	Number of ears	Average rating of pigmentation ¹⁾	
		Endosperm	Embryo
European Flints	89	3,5	4,3
Dents	156	3,7	3,8
Flint x Dent	71	3,6	3,6

¹⁾ The following score was used: 5 - excellent pigmentation, 4 - good pigmentation, 3 - poor pigmentation, 2 - bad pigmentation, 1 - no pigmentation

Tabelle 3: Die Ausprägung des Gens R1-nj bei verschiedenem genetischem Hintergrund des maternalen Genotyps, Freising, 2002

Heterotic group	Total genotypes	Excellent %	Pigmentation		Poor %
			Good %	Satisfactory %	
Dent	45	40,0	31,1	28,9	0,0
Flint	29	3,4	44,8	0,0	51,7
	74	25,7	36,5	17,6	20,3

Tabelle 4: Die Effizienz der untersuchten Methoden zur Produktion von Linien mit verdoppeltem Chromosomensatz

Chromosome doubling in haploid maize plants	Control		Method 1		Method 2	
		%		%		%
Haploids planted	140	100	106	100	140	100
Haploids alive	131	93,6	77	72,9	124	88,6
Haploids fertile	3	2,3	38	49,4	20	16,1
Haploids selfed	1	0,8	30	39	17	11,3
Haploids produced seeds	0	0	21	27	10	8,1

Method 1: Hohenheim
Method 2: Krasnodar

bis 10,9%). Die Induktionsfrequenz scheint somit genetisch bedingt zu sein und es eröffnen sich dadurch Möglichkeiten einer weiteren züchterischen Bearbeitung der Inducerlinien auf hohe Induktionsraten.

Die Schwierigkeiten bei der Selektion Körner mit haploidem Embryo insbesondere bei einigen Flint-Herkünften resultieren aus dem Vorhandensein verschiedener dominanter Gene, die die Anthozyansynthese in der Pflanze unterbinden (*C1-I*, *C2-Idf*, *In1-D*) (COE 1994). Alle diese Gene verursachen, falls sie im maternalen Genotyp vorhanden sind, Probleme beim Erkennen der zu selektierenden Körner, da die Pigmentierung sowohl des Embryos als auch des Endosperms unterbleibt. In Genotypen aus dem Dent-Pool sind diese Gene sehr selten vorhanden, das Erkennen der Hapliden somit kein Problem (RÖBER 1999). Hybriden für den mitteleuropäischen Anbau werden jedoch in der Regel unter Verwendung von Flints hergestellt. Die hier auftretenden Probleme können nur über die Einführung neuer Markersysteme, die nicht auf einer Anthozyanfärbung beruhen (z.B. Herbizidresistenz) oder aber über die Eliminierung von nicht geeignetem Flint-Zuchtmaterial aus dem Programm gelöst werden.

Ein bestimmter Anteil an Körnern (bis zu etwa 50% der Anzahl der Hapliden), die mit einer Inducerlinie bestäubt wurden,

entwickelt keinen Embryo. Es ist anzunehmen, dass embryolose Körner das Resultat einer gestörten Eizellenentwicklung ohne Befruchtung sind. Weiterhin könnte das Vorhandensein letaler Gene im maternalen Genotyp die Entwicklung eines haploiden Embryos verhindern.

Nach der Produktion der Hapliden ist der nächste Schritt das Verdoppeln des Chromosomensatzes um neue homozygote Linien zu erhalten. Hierzu wurden zwei Methoden untersucht, die beide zu einer Chromosomenverdopplung führten. Methode I nach DEIMLING et al. (1997) stellte sich als produktiver hinsichtlich der Anzahl erzeugter DH-Linien heraus und ist auch aus arbeitswirtschaftlichen Gründen eindeutig zu bevorzugen, wenn es um die Produktion einer großen Anzahl von Linien geht.

Die Technologie der *in vivo*-Hapliden Induktion eröffnet auch beim Mais die Möglichkeit zur Entwicklung von homozygotem Linienmaterial über Haploide, wie sie bei anderen Getreidearten schon lange Zeit Realität ist. Zudem handelt es sich um eine Methode, die im Gegensatz zu Verfahren bei anderen Pflanzen durch die *in-vivo*-Induktion ohne nennenswerten Laboraufwand auskommt. Aus diesen Gründen wird sie derzeit in vielen praktischen Maiszuchtprogrammen etabliert und wird sicherlich in naher Zukunft zu einer Standardmethode der Maiszüchtung werden.

5. Literatur

- BORDES, J., R.D. DE VAULX, A. LAPIERRE and M. POLLACSEK, 1997: Haploidisation of maize (*Zea mays L.*) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding. *Agronomie* 17:291-297
- BÜTER, B., 1997: *In vitro* haploid production in maize. In: S. M. Jain, S. K. Sopory and R. E. E. Veilleux (eds), *In Vitro* Haploid Production in Higher Plants, 37-71. Kluwer Academic Publ., Dordrecht
- CHALYK, S.T. and V.A. ROTARENCO, 1999: Using maternal haploid plants in recurrent selection in maize. *Maize Genet Coop Newsllett* 73:56-57
- CHALYK, S.T., 1999: Creating new haploid-inducing lines of maize. *Maize Genet Coop Newsllett* 73:53-54
- CHASE, S.S., 1969: Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays L.*). *Bot Rev* 135:117-167
- COE, E.H., 1959: A line of maize with a high haploid frequency. *Am Nat* 93:381-382
- COE, E.H., 1994: Anthocyanin genetics. In: Freeling M., Walbot V. (eds) *The maize handbook*. Springer Verlag, New York, pp 279-281
- DEIMLING, S., F. RÖBER und H.H. GEIGER, 1997: Methodik und Genetik der *in-vivo*-Haplideninduktion bei Mais. *Vortr. Pflanzenzüchtung* 353:225-226
- ENALEEVA, N.K., V.S. TYRNOV, L.P. SELIVANOVA and A.N. ZAVALISHINA, 1996: Single fertilization and the problem of haploidy induction in maize. *Doklady Biol Sci* 353:225-226
- KATO, A., 2002: Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. *Plant breeding* 121:370-377
- NANDA, D.K. and S.S.CHASE, 1966: An embryo marker for detecting monoploids in maize (*Zea mays L.*). *Crop Sci* 6:213-215
- NOTSUKA, K., T. TSURU and M. SHIRAI-SHI, 2000: Induced polyploid grapes via *in vitro* chromosome doubling. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 69:543-551
- RÖBER, F., 1999: Fortpflanzungsbiologische und genetische Untersuchungen mit RFLP-Markern zur *in-vivo*-Haplideninduktion bei Mais. *Phd Thesis*, Universität Hohenheim
- TYRNOV, V.S. and A.N. ZAVALISHINA, 1984: Inducing high frequency of matroclinal haploids in maize (in Russian). *Dokl Akad Nauk SSSR* 276:735-738
- ZABIROVA, E.R., M.V. CHUMAK, O.A. SHATISKAIA and V.S. SCHERBAK, 1996: Technology of the mass accelerated production of homozygous lines (in Russian). *Kukuruza i sorgo* N 4:17-19