

Aus dem Institut für
Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik
der Universität Hohenheim
Fachgebiet Pflanzenzüchtung und Biotechnologie
Prof. Dr. G. Weber

Bestimmung und Optimierung von Colchicin-Alternativen für die Doppelhaploiden-Technik bei Mais (*Zea mays* L.)

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Agrarwissenschaften (Dr. sc. agr.)
vorgelegt der
Fakultät Agrarwissenschaften
der Universität Hohenheim



von
Dipl.-Agr. Biol.
Katharina Rosalie Häntzschel
aus Esslingen
2011

6. Zusammenfassung

In der Maiszüchtung stellt die Doppelhaploidentechnik eine zeitsparende Alternative gegenüber der herkömmlichen Erzeugung homozygoter Linien dar. Die DH-Technik lässt sich in zwei Schritte unterteilen: 1.) die Induktion von maternalen Hapliden durch Bestäubung mit sogenannten Inducerinien und 2.) die Aufregulierung der Chromosomensätze zur Erzeugung von Doppelhaploiden durch die Behandlung mit einem Mitosegift. Insgesamt können bei jedem Schritt zwischen 1 - 10 % Haploide bzw. Doppelhaploide erzeugt werden. Dies zeigt somit noch ein deutliches Optimierungspotential auf. Zum einen ist der Mechanismus der Haplideninduktion noch nicht vollständig geklärt und die Induktionsraten sind teilweise stark vom jeweiligen Genotyp abhängig. Zum anderen wird zur Aufregulierung der Chromosomensätze immer noch sehr häufig das im Speziellen für Säuger hochtoxische Alkaloid Colchicin eingesetzt. Aufgrund seiner geringen Spezifität für Pflanzenspindeln wird eine relativ hohe Menge an Colchicin benötigt, was die Anwendung teuer und vor allem für den Anwender gefährlich macht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Doppelhaploiden-Technik bei Mais durch die Bestimmung von mindergiftigen und möglichst effizienten Colchicin-Alternativen zu verbessern. Hierfür wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- ♥ Beurteilung von möglichen Colchicin-Alternativen durch Behandlung von Wurzelspitzen (chemische Substanzen, physikalische Methoden).
- ♥ Optimierung der Inkubationsparameter zur Behandlung von Hapliden mit Colchicin-Alternativen.
- ♥ Ermittlung neuer Colchicin-Alternativen über Hochdurchsatz-Screening einer Chemikalien-Bibliothek.
- ♥ Untersuchung des Mechanismus der Haplideninduktion.

Bei der Behandlung von Wurzelmeristemen konnte gezeigt werden, dass die drei Herbizide APM, Oryzalin und Pronamid als Colchicin-Alternativen eingesetzt werden können. Verglichen mit Colchicin weisen sie alle eine deutlich geringere Toxizität für Säuger auf. Außerdem wäre ihr Einsatz durch die deutlich geringer benötigten Konzentrationen auch kosteneffizienter als eine Colchicinbehandlung. Nach Behandlung Haploider konnten jedoch bisher mit keiner Alternativbehandlung Doppelhaploide erzeugt werden.

Die Behandlungsparameter für Colchicin konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter optimiert werden. So zeigte sich durch die Belüftung der Behandlungslösung ein deutlicher Anstieg der Keimlingsvitalität. Außerdem konnten nach der Behandlung zwei Tage alter Keimlinge die meisten Keimlinge mit verdoppeltem Chromosomensatz erzeugt werden. Aufgrund der vielversprechenden Eigenschaften der Herbizide APM, Oryzalin und Pronamid sollten weitere Experimente durchgeführt werden, sobald größere Mengen an haploidem Saatgut zur Verfügung stehen.

Das Screeningverfahren der LATCA-Bibliothek unter Verwendung einer transgenen *Arabidopsis thaliana* Linie zeigte sich als äußerst effektiv zur Ermittlung von Mitoseinhibitoren. Nach Durchführung des Screenings von ~3600 chemischen Substanzen in drei Stufen konnten 51 Kandidaten von Colchicin-Alternativen ermittelt werden. Diese Substanzen sollten durch Behandlung von haploiden Maiskeimlingen genauer evaluiert werden. Denkbar wäre auch das Screening weiterer Bibliotheken zur Entdeckung von Mitoseinhibitoren.

Durch ein besseres Verständnis des Mechanismus der Haploideninduktion könnte diese Technik verbessert und somit der Einsatz von Colchicin eingeschränkt werden. Anhand der bisherigen Ergebnisse können jedoch keine Aussagen über den Mechanismus der Haploideninduktion getroffen werden. Das eingesetzte Testsystem sollte daher noch weiter optimiert werden.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die Effizienz zur Erzeugung doppelhaploider Maispflanzen durch den Einsatz von Colchicin-Alternativen verbessert werden könnte. Außerdem konnten nach einem Screening von ~3600 chemischen Substanzen mittels *A. thaliana* 51 Chemikalien als potenzielle Mitoseinhibitoren detektiert werden.

6. Summary

In maize breeding the production of inbred lines using doubled haploids constitutes a time-saving alternative compared to conventional procedures. The DH-technique can be divided into two separate steps 1.) induction of maternal haploids through the pollination of a desired genotype with pollen of a so-called inducer-line and 2.) doubling of chromosome sets to produce doubled haploids using mitotic inhibitors. Overall, each step yields approximately 1 - 10 % of haploids or doubled haploids, respectively. This shows the technique still has room for improvement: The mechanism of haploid induction is not fully understood and in addition induction rates are genotype dependent. Most often the highly toxic alkaloid colchicine is used for doubling chromosome sets of haploids. Because of its low efficiency on microtubules of plants a relatively high concentration of colchicine is needed. Consequently, its application is expensive and above all poses a high risk for the user.

The present study is aimed at optimizing the DH-technique in maize by defining less toxic and efficient colchicine-alternatives. This work was organized as follows:

- Evaluation of possible colchicine-alternatives by treating root tips (chemical substances, physical methods).
- Optimizing treatment conditions of haploids with colchicine-alternatives.
- Discovery of new substances by high-throughput-screening of a chemical library.
- Analysis of the mechanism of haploid induction.

By treating root tips of diploid seedlings it was shown that three herbicides APM, oryzalin, and pronamide may be used as colchicine-alternatives. Compared to colchicine they are all less toxic to mammals. Furthermore, lower concentrations are required, i.e. the herbicides were more cost-efficient than colchicine. However, after the treatment of haploid seedlings no doubled haploids were produced by colchicine-alternatives

In this study, treatment parameters for colchicine were further optimized. For instance, it was shown that aeration during treatment can improve the viability of seedlings. Furthermore, an increased proportion of seedlings with doubled chromosome sets could be obtained when two day old seedlings were treated. Regarding the promising properties of the herbicides APM, oryzalin, and pronamide experiments should be performed if larger quantities of haploid seeds become available.

The screening system developed for the LATCA-library using a transgenic line of *Arabidopsis thaliana* is a highly effective system for discovering mitotic inhibitors. After screening ~3600 substances 51 candidates of colchicine-alternatives were discovered. Those substances should be further evaluated by treating haploid maize seedlings. Using this approach, other libraries are available for screening for mitotic inhibitors.

A better understanding of the mechanism of haploid induction could lead to an improvement of the DH-technique and therefore a decrease of colchicine usage. However, regarding the results obtained so far the mechanism of haploid induction cannot be clarified. However, this system can be further optimized.

This study has shown that the efficiency of generating doubled haploids in maize breeding may be improved by using colchicine-alternatives. Furthermore, by screening 3600 biologically active compounds with *A. thaliana* 51 chemicals were discovered which are putative mitotic inhibitors.