



Doctoral Thesis

Einflussfaktoren der in vitro Haploidinduktion bei Zea mays L.

Author(s):

Büter, Bernhard

Publication Date:

1992

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000653863> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS ETH Nr. 9725

Thema: EINFLUSSFAKTOREN DER IN VITRO HAPLOID-
INDUKTION BEI *ZEA MAYS* L..

Abhandlung zur Erlangung des Titels: DOKTOR DER TECHNISCHEN WISSENSCHAFTEN

Vorgelegt von: Bernd Büter

Biologe (1. Staatsexamen: Höheres
Lehramt); Universität Hannover.

Dipl. Agraringenieur; GH Kassel.

geboren am 30.11.1957

in Vrees (BR Deutschland).

Staatsangehörigkeit: Deutsch.

Angenommen auf Antrag von: Prof. Dr. Peter Stamp (Referent)

Prof. Dr. Ingo Potrykus (Korreferent)

Dr. Jürg E. Schmid (Korreferent).

Zürich, 1992.

5. Zusammenfassung

Unter geeigneten in vitro Kultur Bedingungen verlassen Mikrosporen den üblichen, gametophytischen Entwicklungsweg und bilden makroskopische, multizelluläre Strukturen aus, die funktional zygotischen Embryonen entsprechen (= embryoähnliche Strukturen = ES). Nach spontaner oder induzierter Verdoppelung des Chromosomensatzes können aus diesen ES fertile, vollständig homzygote, doppelhaploide Pflanzen regeneriert werden (= in vitro Androgenese).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung verschiedener Einflussfaktoren der in vitro Androgenese bei *Zea mays*. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Induktion der Androgenese, ausgedrückt durch die Frequenz der ES-Bildung (ES/100 Antheren). Der experimentelle Teil der Arbeit war vornehmlich im Bereich der Antherenkultur angesiedelt, in geringerem Umfang waren auch Versuche zur Kultur isolierter Mikrosporen enthalten. Sechs Genotypen wurden eingesetzt (FELIX, CH13, SENECA 60, H99XFR16, PA91XFR16, DAN SAN 91) für die Bearbeitung folgender Themenkomplexe:

a. Gametozidwirkungen

Zwei Gametozide: CGA1 und CGA (CIBA GEIGY LTD., Basel) -vorher erfolgreich in der Weizen-Antherenkultur eingesetzt- wurden als Komponenten des Induktionsmediums sowie als Agens zur Spenderpflanzen-Behandlung verwendet. Während CGA1 keine positiven Effekte zeigte, bewirkte CGA insbesondere nach Applikation auf die Spenderpflanzen eine Steigerung der ES-Bildung. Die besten Resultate wurden mit der Konzentrationsstufe 30 mg CGA/Pflanze, aufgeteilt in zwei Gaben unmittelbar vor und nach der Meiose der Pollenmutterzellen, erzielt (7.1 vs. 0.3 ES/100 Antheren bei den Kontrollpflanzen; Genotyp FELIX).

b. Temperatur-Nachbehandlungen per se und in Kombination mit L-Prolin (= PROL)

Ein Vergleich verschiedener Temperatur-Nachbehandlungen mit dem Kontrollverfahren (27°C) ergab, dass sowohl Kälte- als auch Hitze-Stress -ausgeübt auf inokulierte Antheren bzw. Mikrosporen- die ES-Frequenz erhöhten. Dabei wurden genotyp-abhängige

Reaktionen festgestellt: bei zwei getesteten Genotypen zeigten sich die maximalen ES-Frequenzen nach einer Kälte-Behandlung (H99XFR16, PA91XFR16), bei zwei weiteren nach einer Wärme-Behandlung (SENECA 60, DAN SAN 91). Die besten Ergebnisse resultierten aus der Applikation moderater Stressbedingungen, d.h. Kälte- bzw. Wärme-Behandlungen bei 14°C:7-10 d bzw. 30°C:14 d). In der Kultur isolierter Mikrosporen führten kalte Temperaturen zu einer Verzögerung, warme Temperaturen zu einer Beschleunigung des Absterbens der Mikrosporen; eindeutige Einflüsse auf die ES-Frequenz wurde nicht beobachtet.

Die Addition von PROL (125 mg/l) zum Induktionsmedium erlaubte eine zusätzliche, 2 - 3-fache Steigerung der positiven Effekte von Kältstress-Behandlungen per se. In den besten Verfahren ergaben sich so ES-Frequenzen von 143.5 bzw. 153.0 ES/100 Antheren (PA91XFR16 bzw. DAN SAN 91).

PROL in Kombination mit Wärmestress führte nicht zu einer zusätzlichen Steigerung der ES-Bildung im Vergleich zu Wärmestress-Behandlungen per se.

In der Kultur isolierter Mikrosporen hatte PROL (125 mg/l) weder auf die Frequenz lebender Mikrosporen noch auf die ES-Bildung einen eindeutig positiven oder negativen Einfluss. Die analoge Verwendung anderer Medienkomponenten mit potentiell stressprotektiver Wirkung (Abscisinsäure, L-Amino-Buttersäure) führte nicht zu Steigerungen der ES-Bildung.

c. Aktivkohle (= AK)

Durch Adsorption inhibitorischer Substanzen im Medium übt AK einen positiven Einfluss auf die in vitro Androgenese aus. Gewöhnlich bleibt ihre Verwendung auf Festmedien beschränkt, da freischwebende Ak-Partikel in Flüssigmedien Bonituren erschweren und die ES-Bildung und -differenzierung durch Anhaften an Antheren bzw. ES behindern. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass markante Steigerungen der ES-Bildung selbst dann erzielt werden, wenn die Aktivkohle bereits vor der Anthereninokulation aus dem autoklavierten Medium entfernt wird. Die maximalen ES-Frequenzen mit dem Genotyp DAN SAN 91 wurden bei Aktivkohle-Konzentrationen von 5 g/l (Einwirkzeit: 96 Stunden; 224.6 ES/100 Antheren) bzw. 10 g/l (Ein-

wirkzeit: 24 Stunden; 160.7 ES/100 Antheren) erreicht. Inhibitorisch wirkende Substanzen in autoklavierten, flüssigen Medien entstehen hauptsächlich durch Degradation hitze-labiler Komponenten, insbesondere der Saccharose. Die Verwendung von Aktivkohle in nicht-autoklavierten, sterilfiltrierten Medien blieb dementsprechend ohne Auswirkung auf die ES-Bildung. Allerdings war die in autoklavierten Medien mit "Aktivkohle-Reinigung" ermittelte ES-Frequenz mehr als doppelt so hoch wie diejenige in identischen, sterilfiltrierten Medien; mit dem Autoklavieren scheint somit auch ein positiver Effekt verbunden zu sein. Weitere Resultate führten zu der Vermutung, dass die hitzebedingte, partielle Saccharose-Degradation zu D-Glucose und D-Fructose für diesen Effekt verantwortlich ist.

d. Aminosäuren

In der Mais-Antherenkultur hat sich die Verwendung des aminosäurereichen Komplexadditivs: Caseinhydrolysat als Komponente des Induktionsmediums etabliert. Ein Vergleich von säurehydrolysiertem (= CAH; 500 mg/l) und enzymhydrolysiertem Casein (= CEH; 500 mg/l) mit einem aminosäurefreien Medium ergab eine geringfügige Steigerung der ES-Bildung durch CAH, jedoch eine deutliche Verringerung durch CEH. In anschließenden Versuchen mit 11 individuell applizierten Aminosäuren wurde die Wirkung von CAH durch L-Asparagin, L-Glutamin und Glycin substituiert bzw. übertroffen. Die höchste ES-Frequenz erzielte das Verfahren: 250 mg/l L-Glutamin (427.3 ES/100 Antheren; DAN SAN 91).

Durch Kombination verschiedener, methodischer Optimierungen (Kältestress: 14°C:7-10 Tage, PROL [125 mg/l]; flüssiges, autoklaviertes Induktionsmediums mit AK [5 g/l; Einwirkzeit: 24 Stunden]; L-Glutamin [250 mg/l] konnte die ES-Bildung gegenüber dem Ausgangsniveau erheblich gesteigert werden (388.7 vs. 6.1 bzw. 427.3 vs. 17.6 ES/100 Antheren; PA91XFR16 bzw. DAN SAN 91). Diese Optimierungen waren auch auf Sorten der aktuellen schweizerischen Sortenliste Mais (KARAT, ARIKANA, FELIX) übertragbar. Dem methodischen Ansatz kommt damit eine wichtige Funktion im Hinblick auf eine zukünftige Nutzung der in vitro Androgenese in der Maiszüchtung zu.

5. Summary

Under appropriate in vitro culture conditions microspores deviate from the normal gametophytic pathway and form multicellular, macroscopic structures functionally similar to zygotic embryos (= embryo-like-structures = ES). After spontaneous or induced chromosome doubling these ES can give rise to completely homozygous, fertile, doubled haploid plants (= in vitro androgenesis).

The present studies were initiated in order to investigate different factors affecting in vitro androgenesis in *Zea mays* L.. Priority was given to factors involved in the induction of the androgenetic development, expressed by the frequency of ES-formation (ES/100 anthers). Most experiments used the anther culture system. To a smaller extent experiments with mechanically isolated microspores also were employed. Six genotypes were included in the studies (CH13, DAN SAN 91, FELIX, H99XFR16, PA91XFR16, SENECA 60).

The following subjects were investigated:

a. Gametocides

Two gametocides (CGA1, CGA; CIBA GEIGY LTD., Basel), in previous experiments successfully applied to wheat anther culture, were used as components of the induction medium as well as agents for donor plant treatments. CGA1 proved to be inhibitory in both cases whereas CGA-application resulted in positive effects, especially in the donor plant treatments. The best results were obtained with a CGA-concentration of 30 mg/plant, divided into two doses of 15 mg/plant and applicated immediately before and after meiosis of the pollen mother cells (7.1 ES/100 anthers vs. 0.3 ES/100 anthers in the control; FELIX).

b. Post-plating temperature treatments per se and in combination with L-proline

Comparison of different post-plating temperature regimes with a control treatment (27°C) revealed that both cold as well as heat stress increased the production of ES in anther culture. Four different genotypes were tested and genotype-specific reactions were observed: two genotypes showed maximum ES-fre-

quencies after a short-term cold treatment (H99XFR16, PA91XFR16), the other two gave better results after a heat treatment (SENECA 60, DAN SAN 91). Best effects were obtained with moderate stress conditions, i.e. cold treatments at 14°C: 7-10 days or heat treatments at 30°C:14 days.

In the culture of isolated microspores cold temperatures delayed and heat temperatures accelerated the abortion of microspores. Clear impacts on ES-formation were not observed.

The beneficial effects of short-term cold treatments per se in anther culture were magnified 2 - 3 times when L-proline was added to the induction medium (125 mg/l). In the best treatments ES-frequencies as high as 143.5 and 153.0 ES/100 anthers resp. were observed (DAN SAN 91 - 14°C:4 days and PA91XFR16 - 14°C:10 days resp.).

L-proline in combination with heat temperatures did not result in a clear additional increase of ES-formation compared with heat temperatures per se.

In the culture of isolated microspores L-proline (125 mg/l) had no beneficial effect neither on viability nor on ES-production.

Analogous addition of abscisic acid or L-amino-butyric acid instead of L-proline did not result in a higher amount of ES in anther culture.

c. Activated charcoal (= AC)

AC promotes *in vitro* androgenesis by adsorbing inhibitory compounds present in the induction medium. Its use generally is limited to semisolid induction media, since in liquid media activated charcoal complicates observation and disturbs ES-formation and -differentiation by adhering to anthers and/or ES. Results presented here indicate that ES-production greatly is improved even when AC only is present in the medium during autoclaving and is subsequently removed before anther inoculation. Maximum ES-values were obtained with 5 g/l AC (AC removed 96 hours after autoclaving: 224.6 anthers; DAN SAN 91) resp. 10 g/l AC (AC removed 24 hours after inoculation: 160.7 ES/100 anthers; DAN SAN 91).

Inhibitory compounds present in liquid, autoclaved media main-

ly are due to degradation of heat-unstable substances, especially of sucrose. In non-autoclaved, filter-sterilized media the addition of AC consequently did not result in any effect on ES-production. However, ES-production obtained with autoclaved media was more than twice as high as ES-production of identically composed, filter-sterilized media, provided AC was present during autoclaving. Further results suggested that the partial sucrose breakdown into D-glucose and D-fructose during autoclaving has a stimulatory effect on ES-formation in maize anther culture. AC allows to exploit this potential beneficial effect of autoclaving by removing inhibitory compounds produced simultaneously during autoclaving.

d. Amino acids

Caseinhydrolysate, a complex-additive rich in amino acids, frequently is used as a component of the induction media in maize anther culture. Comparison of acid-hydrolysed (CAH, 500 mg/l) and enzyme-hydrolysed Casein (CEH, 500 mg/l) with a medium lacking amino acids revealed a slight improve in ES-formation by CAH, but a striking decrease by CEH.

Attempts were made in order to substitute CAH by the addition of individual exogenous amino acids to the induction medium. 11 amino acids were investigated; increased ES-frequencies were obtained with L-asparagine, L-glutamine and glycine, attaining a maximum ES-formation of 427.3 ES/100 anthers using the genotype DAN SAN 91 (250 mg/l L-glutamin).

The combination of several optimized factors described above (cold treatment 14°C:7-10 days, L-proline [125 mg/l]; liquid, autoclaved induction medium with AC [5 g/l], removed 24 hours after autoclaving; L-glutamine [250 mg/l]) allowed a considerable increase in ES-production compared to the initial level (388.7 vs. 6.1 and 427.3 vs. 17.6 ES/100 anthers; PA91XFR16 and DAN SAN 91 resp.). These methodical improvements also proved to be significant in commercial maize varieties currently used in Switzerland (KARAT, ARIKANA, FELIX), thus underlining the importance of the methodical approach to realize a future utilization of in vitro androgenesis in maize breeding.