

DISS. ETH No. 14 920

**Combination of *in vitro* anrogenesis and biolistic transformation: an
approach for breeding transgenic maize (*Zea mays* L.) lines**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by

Ingrid E. Aulinger

Ing. Agr. USAL Argentina

Born April 10, 1974

Citizen of Germany and Argentina

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Peter Stamp, examiner

Dr. Jürg E. Schmid, co-examiner

Dr. Stefan O. Peter, co-examiner

Summary

The combination of *in vitro* androgenesis and genetic transformation has been successfully applied to many species for the rapid development of fully homozygous transgenic lines. Despite repeated efforts to apply this strategy to maize (*Zea mays* L.), success has not yet been achieved.

The original goal of this doctoral work was to develop a protocol for the transformation of haploid or double haploid material in maize, following two basic strategies:

- 1) the biolistic transformation of isolated microspores and
- 2) the transformation of gametic embryos by applying a very efficient protocol developed for the biolistic transformation of immature zygotic embryos of maize.

The main aspects that were addressed in the development of these protocols were:

- the optimisation of the androgenic response, e.g. a high yield of induced microspores in the isolated microspore culture and a high number of gametic embryos by means of anther culture,
- the induction of secondary embryogenesis from gametic embryos and the efficient regeneration of the secondary embryos into double haploid plants,
- the analysis of double haploid material with regard to the level of homozygosity achieved,
- the study of the transgene expression in the target material (microspores, gametic embryos and immature zygotic embryos of a transformable genotype as a positive control) and
- the response of the transformed material to the selection method.

Each of the above plays an essential role in the establishment of a transgenic double haploid line.

The experiments performed during this doctoral work showed that the isolated microspore culture does not yield a sufficient number of gametic embryos, despite a significant improvement achieved by adding activated charcoal to the microspore culture. Furthermore, only 30 % of these gametic embryos presented a doubled chromosome set. The regeneration of the gametic embryos into plants was improved by means of an indirect regeneration method, based on the induction of somatic embryogenesis prior to regeneration. Still, the overall efficiency of the isolated microspore method is too low; thus, microspores are an unsuitable target for genetic transformation. Furthermore, transgene expression was not observed when the microspores were bombarded with a visual marker gene construct.

In contrast, the anther culture gave an extremely high yield of gametic embryos. These were responsive to the induction of secondary embryogenesis but were not as efficient as the positive control zygotic embryos. The secondary embryos of gametic origin showed a satisfactory regeneration capability, though lower than that of the control. On average, 54 % of

the regenerated plants were double haploid. A molecular marker study performed on four double haploid lines demonstrated that the material gained by androgenesis has a highly homozygous background. The experiments on the transformation of gametic embryos showed that the transgene was successfully delivered into the gametic embryos. However, the density of transiently transformed cells (by means of the density of cells expressing a visual marker gene) was much higher for the control zygotic than for the gametic embryos. The selection mechanism, based on the resistance to the herbicide Basta conferred by the *pat* transgene, seemed to have a toxic effect on non-transformed and, indirectly, on transformed cells of the gametic embryos.

Compared to the control zygotic embryos, the overall weaker response of gametic embryos to the determinant steps for a successful transformation determined that the establishment of a double haploid line from transformed gametic embryos was not achieved. Nevertheless, the gametic embryos could probably be transformed if some of the key steps were optimised even further.

Since the transformation of haploid or double haploid material was not achieved, another approach was taken to achieve the rapid development of double haploid and transgenic lines. The strategy was based on the extraction of transgenic double haploid lines from the cross between a transgenic (non-androgenic) and an androgenic genotype by means of anther culture. This approach was successful, even though it was very inefficiency. Nevertheless, this was the first time that transgenic and fully homozygous maize lines were achieved by the combination of genetic transformation and *in vitro* androgenesis.

It was concluded from this work that the combination of genetic transformation and *in vitro* androgenesis might be applied for the development of homozygous and transgenic maize lines. The key processes that limit the establishment of a reproducible and efficient protocol have been identified.

Zusammenfassung

Die Kombination von *in vitro* Androgenese und genetischer Transformation wurde erfolgreich für die Erzeugung transgener homozygoter Linien bei verschiedenen Pflanzenarten angewendet. Alle Versuche, diese Strategie bei Mais (*Zea mays* L.) einzusetzen, sind bisher jedoch fehlgeschlagen.

Die Zielsetzung dieser Dissertation war es, ein Protokoll für die Transformation von haploiden oder doppelhaploiden Strukturen bei Mais zu entwickeln. Für diesen Zweck wurden zwei Strategien verfolgt:

- 1) die biologische Transformation von Mikrosporen und
- 2) die Transformation von gametischen Embryonen mittels eines effizienten Protokolls für die Transformation von zygotischen Embryonen bei Mais.

In der Entwicklung dieser Protokolle wurden folgende Aspekte betrachtet:

- die Optimierung des androgenetischen Prozesses über Mikrosporen- und Antherenkultur,
- die Induktion der sekundären Embryogenese aus gametischen Embryonen und deren effizienten Regeneration zu doppelhaploiden Pflanzen,
- die Bestimmung des Homozygotiegrades der doppelhaploiden Pflanzen,
- die Analyse der Transgenexpression im Explantat (Mikrosporen, gametische und zygotische Embryonen eines transformierbaren Genotyps als positive Kontrolle) und
- das Verhalten des transformierten Materials unter Selektionsdruck.

All diese Faktoren spielen eine essentielle Rolle in der Etablierung einer transgenen doppelhaploiden Linie.

Die Ergebnisse der in dieser Dissertation durchgeführten Experimente ergaben, dass die Mikrosporenkultur eine zu geringe Zahl von gametischen Embryonen liefert; dies trotz einer gesteigerten Effizienz, welche durch die Zugabe von Aktivkohle in das Kulturmedium erzielt wurde. Nur 30 % dieser gametischen Embryonen hatten einen verdoppelten Chromosomensatz. Die Regenerationsrate von Pflanzen aus gametischen Embryonen wurde durch die Anwendung eines indirekten Regenerationsverfahren verbessert, welches auf die Induktion der somatischen Embryogenese vor der Induktion der Pflanzenregeneration basiert. Dennoch ist die allgemeine Effizienz dieser Methode zu niedrig, um Mikrosporen als Ziel der genetischen Transformation in Betracht zu ziehen. Zudem wurde in einem Transformationsexperiment mit einem visuellen Markergen keine Expression des Transgens in Mikrosporen gefunden.

Im Gegensatz zu der Mikrosporenkultur, gab die Antherenkultur eine sehr hohe Ausbeute von gametischen Embryonen. Diese Embryonen zeigten eine gute Antwort in Bezug auf sekundäre Embryogenese, obwohl diese geringer als die der positiven Kontrolle (zygotische Embryonen)

war. Die sekundären Embryonen aus gametischer Herkunft wiesen eine gute Regenerationsfähigkeit auf, die jedoch schlechter als die der Kontrolle war. Durchschnittlich 54 % der Pflanzen aus der Antherenkultur hatten einen verdoppelten Chromosomensatz. Eine Studie mittels molekularer Marker bestätigte, dass die doppelhaploiden Pflanzen einen hohen Homozygotiegrad hatten. Die Ergebnisse der Transformation von gametischen Embryonen zeigten, dass das Transgen vollständig in das Genom integriert wurde. Dennoch war die Menge an transformierten Zellen geringer in gametischen als in zygotischen Embryonen. Der in dieser Arbeit angewendete Selektionsmechanismus basierte auf die Resistenz gegen das Herbizid Basta, welche durch das *pat* Gen verliehen wird. Dieser Mechanismus entwickelte jedoch einen toxischen Effekt auf nicht transformierte und indirekt auf transformierte Zellen.

Die allgemein schlechtere Leistung der gametischen im Vergleich zu zygotischen Embryonen in Bezug auf die analysierten Aspekte bedingte, dass die Erzeugung transgener doppelhaploider Linien aus transformierten gametischen Embryonen nicht erreicht werden konnte.

Dennoch könnten gametische Embryonen potentiell transformiert werden, wenn eine weitere Optimierung bestimmter Schritte erreicht würde.

Nachdem die Transformation von Mikrosporen oder gametische Embryonen nicht erreicht wurde, wurde ein anderer Ansatz unternommen, um innerhalb weniger Generationen homozygote und transgene Pflanzen zu entwickeln. Diese Strategie basierte auf der Erzeugung von doppelhaploiden transgenen Pflanzen aus der Kreuzung zwischen einem transgenen nicht-androgenetischen Genotyp und einem androgenetischen Genotyp mittels Antherenkultur. Dieser Ansatz war erfolgreich, obwohl die Ausbeute mittels dieser Methode sehr gering war. Die Erzeugung transgener und homozygoter Maislinien über die Kombination von der *in vitro* Androgenese und der genetischen Transformation wurde bis *dato* nicht publiziert.

Die vorliegende Arbeit führte zu der Schlussfolgerung, dass die Kombination von *in vitro* Androgenese und genetischer Transformation zur Entwicklung von transgenen und homozygoten Maislinien dienen kann. Die Prozesse, die die Etablierung eines effizienten Protokoll für die Erzeugung von transgenen und doppelhaploiden Linien limitieren, wurden verifiziert.