1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

1.1.1 Botanik

Mais *Zea mays* L. (Abb. 1.1 a) gehört zu den wichtigsten Kulturarten der heutigen Zeit und ist ein sogenannter Modellorganismus der Forschung. Es handelt sich um eine monokotyle C4-Pflanze, welche der Familie der Süßgräser, *Gramineae* (*Poaeae*) zugeordnet wird. Mais ist eine annuelle monözische Pflanzenart, bei der die männlichen Blütenstände (Fahnen) am oberen Teil der Pflanze gebildet werden und die weiblichen Blütenstände (Kolben) am unteren und mittleren Teil der Pflanze an den Blattachseln (Raven *et al.*, 2006; Strable & Scanlon, 2009; DMK, 2011). Desweiteren hat Mais (2n = 20) einen DNA-Gehalt von 4,75-5,63 pg und das Mais-Genom besteht aus 2292-2716 Mbp (Arumuganathan & Earle, 1991).

Alle angebauten Kulturformen gehören der Art *Zea mays* L. an, welche eine sehr hohe Vielfalt aufweist (Abb. 1.1 b). Maissorten lassen sich vor allem anhand der Kornform in mehrere Gruppen unterteilen, wobei Zahnmais (dent) und Hartmais (flint) im Anbau die wichtigste Rolle spielen (DMK, 2011).

Abbildung 1.1 Mais (*Zea mays* L.)
a Illustration mit männlichen und weiblichen Blütenständen (von O. W. Thomé, 1885)
b Vielfalt der Art *Zea mays* L. (K. Weller, 2006)

Eine Besonderheit moderner Maispflanzen ist, dass sie zwar hochspezialisiert sind, jedoch ohne menschliches Zutun, nicht fähig sind sich zu verbreiten (Jugenheimer, 1976).

1.1.2 Geschichte

Mais stellt ein beeindruckendes Beispiel für die Evolution der Kulturpflanzen dar und wird häufig auch als Geschenk der Indianer bezeichnet (Brandenberg, 1976; Becker, 1993). Wie

in Abb. 1.2 dargestellt hat Mais seine Ursprünge in Mexiko, wo Ureinwohner Vorformen des heutigen Mais schon bereits vor über 6000 Jahren kultivierten (Matsuoka *et al.*, 2002). In Europa wurde Mais im Jahre 1493 durch Kolumbus eingeführt, wobei die Bedeutung des Anbaus in Deutschland erst seit 1950 zunahm (Becker, 1993). Betrachtet man die Menge an Veröffentlichungen, sowie die Anzahl an Forschern, die sich früher, wie heute mit Mais beschäftigen, so zählt Mais zu den am besten erforschten Kulturpflanzen unserer Zeit.

Abbildung 1.2 Mais als Beispiel für die Evolution der Kulturpflanzen (L. Houser, 1938)

Über die Abstammung des ursprünglichen Mais gibt es mehrere Theorien, wobei bis zur Mitte der 1990er Jahre vor allem zwei Theorien vorherrschten. Zum einen entwickelte Beadle bereits 1939 die Theorie, dass Mais eine domestizierte Form von Teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) ist (Beadle, 1939). Zum anderen besteht die sogenannte „Tripartite"-Theorie, welche vor allem durch Mangeldorf und Reeves (1938) geprägt wurde. Hier geht man davon aus, dass Mais aus einer Wildform entstand und Teosinte hingegen das Ergebnis einer Kreuzung aus Mais und Gamagras (*Tripsacum dactyloides* L.) ist. Später wurde vor allem durch Eubanks (1995) die Theorie aufgestellt, dass Mais möglicherweise aus einer Kreuzung von Gamagras und Teosinte entstand. Betrachtet man die aktuelle Literatur, so scheint vor allem die von Beadle geprägte „Teosinte-Theorie" (Mais = domestizierte Form von Teosinte) am wahrscheinlichsten (Doebley, 1994; Bennetzen *et al.*, 2001; Doebley, 2004).

1.1.3 Anbau und Verwendung von Mais

Neben Weizen und Reis ist Mais eine der am häufigsten angebauten und somit wichtigsten Kulturpflanzen. Betrachtet man die weltweite Maisproduktion, so wird der Hauptanteil von ca. 80 % als Futtermittel (65 %) bzw. Nahrungsmittel (15 %) verwendet. Hauptproduzent sind mit einem Anteil von ca. 40 % (~330Mt) die USA (FAO, 2006; FAO, 2009).

Wie bereits 1976 bei Jugenheimer beschrieben, weist Mais ein großes Spektrum an Verwendungsmöglichkeiten auf (Jugenheimer, 1976). So wird Mais vor allem aufgrund des hohen Stärkegehalts als Vieh-Futtermittel eingesetzt. Desweiteren ist Mais ein wichtiges Grundnahrungsmittel und wird hierfür in vielfältigster Weise verarbeitet Außerdem findet Mais wiederum aufgrund des hohen Stärkegehalts in vielen industriellen Prozessen (Papier, Biokunststoff, Chemikaliensynthese) Anwendung. Eine deutliche Zunahme kann heutzutage in der Verwertung von Mais zu Bioethanol und zu Biogas verzeichnet werden (FAO, 2006; DMK, 2011).

1.1.4 Maiszüchtung allgemein

Mais ist ein klassisches Objekt der Züchtungsforschung und wird vor allem als Hybridsorte gezüchtet und angebaut. Diese Zuchtmethodik lässt sich in drei Schritte aufteilen: 1. Erzeugung homozygoter Elternlinien, 2. Testkreuzungen und Selektion geeigneter Linien, 3. Kreuzung der Elternlinien und Selektion der Hybridsorte. Meist ist der erste Schritt, d. h. die Entwicklung der Inzuchtlinien die aufwendigste Phase der Hybridzüchtung. (Becker, 1993). Am schnellsten können homozygote Linien über die sogenannte Doppelhaploiden-Technik erzeugt werden (Devaux & Pickering, 2005). Mittels dieser Technik können aus einer segregierenden Population homozygote, heterogene Linien ohne aufwendige Rückkreuzungen erstellt werden (Lee & Tracy, 2009). Es wird angenommen, dass der Fortschritt im Bereich der Maiszüchtung mit der Entwicklung von doppelhaploiden (DH)-Linien deutlich voranschreiten wird (Geiger & Gordillo, 2009). Auch das Interesse der großen Züchterfirmen an der DH-Technik hat in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen. Da zur Erzeugung Doppelhaploider vor allem in den Ablauf der Befruchtung und des Zellzyklus der Maispflanzen eingegriffen wird, sollen diese Prozesse zunächst genauer geschildert werden.

1.2 Lebenszyklus von *Zea mays* L. und Bildung der Folgegeneration

Der Lebenszyklus einer Maispflanze beinhaltet den Wechsel zwischen diploider sporophytischer Phase und haploider gametophytischer Phase. Über eine meiotische Teilung entstehen aus der diploiden Mikrosporenmutterzelle haploide Mikrosporen (Pollenkörner). Die Pollenkörner durchlaufen schließlich zwei mitotische Teilungen aus denen pro Pollenkorn ein dreizelliger männlicher Gametophyt hervorgeht. Dieser beinhaltet die vegetative Zelle, sowie zwei Spermazellen, welche den generativen Teil bilden (Abb. 1.3 a). Auf der weiblichen Seite entstehen über Meiose aus der diploiden Megasporenmutterzelle vier haploide Megasporen, von denen jedoch drei degenerieren. Aus der nicht degenerierten Megaspore entwickelt sich über zwei mitotische Teilungen der achtkernige Embryosack (Abb. 1.3 b), welcher den reifen weiblichen Gametophyten darstellt. Der Embryosack besteht aus drei Antipoden, zwei Synergiden, der Eizelle (mit Synergiden = Eiapparat), sowie der zweikernigen (Polkerne) Zentralzelle, oder auch Embryosackkern.

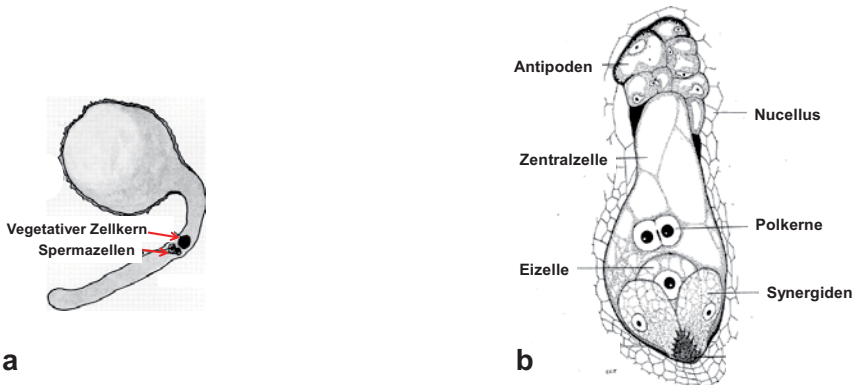

Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der reifen Gametophyten (Größenverhältnis nicht gleich)
a männlicher Gametophyt (am Beispiel von *Arabidopsis,* nach McCormick, 2004)
b weiblicher Gametophyt (nach Diboll & Larson, 1966)

Sind beide Gametophyten gereift, erfolgt die sogenannte doppelte Befruchtung und anschließende Entwicklung des diploiden Samen (Abb. 1.4). Erreicht ein Pollenkorn die Staubfäden, so bildet die vegetative Zelle den sogenannten Pollenschlauch aus. Sobald dieser den Embryosack erreicht, werden die zwei Spermazellen meist in eine der beiden Synergiden entleert. Darauffolgend verschmilzt eine Spermazelle mit der Eizelle und bildet die sogenannte Zygote. Die andere Spermazelle dagegen verschmilzt mit den Polkernen und es entsteht der triploide Endospermkern. Durch die darauffolgenden mitotischen Teilungen entsteht aus der Zygote der Embryo und aus dem Endospermkern das Endosperm. Erst mit Beginn der Samenkeimung setzt der Embryo seine Entwicklung fort und wächst zu einem neuen Sporophyten heran. Somit kann der Lebenszyklus wieder von vorn beginnen (Jensen, 1973; Nultsch, 2001; Candela & Hake, 2008; Lüttge *et al.*, 2010).

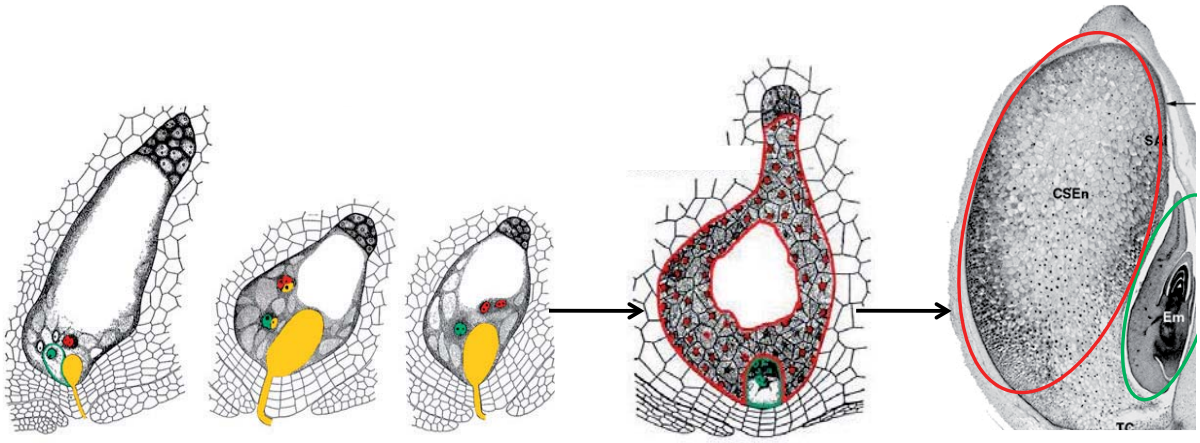

Abbildung 1.4 Doppelte Befruchtung bei Mais
Entwicklung des Maiskorns nach doppelter Befruchtung und Bildung von Embryo und Endosperm (verändert nach Sabelli & Larkins, 2009). gelb = Pollenschlauch mit Spermazellen; rot = Polkerne der Zentralzelle, bzw. Endosperm; grün = Eizelle, bzw. Zygote, bzw. Embryo

1.3 Zellzyklus

Mit der Samenkeimung beginnt ein neuer Lebenszyklus. Die Keimung wird nach der Quellungsphase zunächst mit einer Zellstreckungsphase gestartet. Darauffolgend beginnen Wachstum und Entwicklung der neuen Pflanze (Lüttge *et al.*, 2010). Die Pflanzenentwicklung ist durch unbestimmtes Wachstum und wiederholte Organogenese charakterisiert und somit mit ständiger Zellteilung verbunden (Dewitte & Murray, 2003). Hierfür durchlaufen die Zellen der bereits im Embryo angelegten Meristeme den sogenannten Zellzyklus.

1.3.1 Ablauf und Phasen des Zellzyklus

Der Zellzyklus wird in vier Phasen aufgeteilt (G_1-Phase, S-Phase, G_2-Phase und Mitose) welche in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt sind. Der Zyklus beginnt mit der Bildung einer Zelle und endet mit der Zellteilung und somit der Entstehung von zwei Tochterzellen. Die G_1-Phase (G = Gap = Lücke) ist vor allem durch Zellwachstum, sowie RNA- und Proteinsynthese charakterisiert. Darauffolgend gehen die Zellen entweder in die nächste Phase über, oder sie bleiben in der sogenannten G_0-Phase und differenzieren sich zu Gewebe-

zellen. Geht die Zelle in die S-Phase über, so wird hier die gesamte DNA der Zelle repliziert (S = Synthese). Nach erfolgreicher DNA-Replikation durchläuft die Zelle die sogenannte G_2-Phase, in der sie vor allem weiter an Größe zunimmt und die Synthese von RNA und Proteinen fortsetzt. In der G_1- und G_2-Phase werden außerdem die Zellorganellen vermehrt. Auf die G_2-Phase folgt dann die Mitose, d. h. die Teilung der Zelle und somit Entstehung von zwei Tochterzellen. Innerhalb des Zellzyklus werden die Übergänge zwischen den einzelnen Phasen an Kontrollpunkten vor allem durch sogenannte Schlüsselproteine (Cycline) gesteuert. Ein wichtiger Kontrollpunkt (in Abb. 1.4 durch roten Pfeil hervorgehoben) ist bspw. der Übergang von der G_1-Phase zur S-Phase bzw. G_0-Phase (Alberts *et al.*, 2001; Nultsch, 2001; Lüttge *et al.*, 2010).

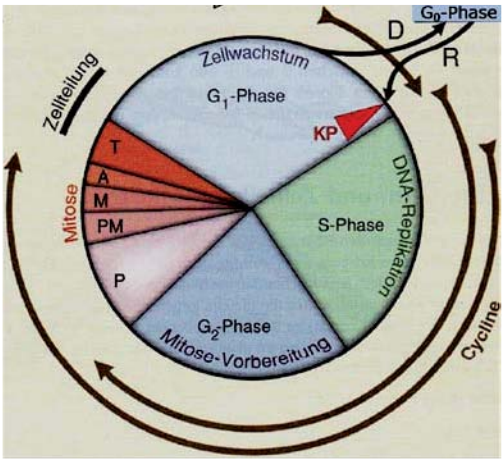

Abbildung 1.5 Phasen des Zellzyklus
(nach Lüttge *et al.*, 2010)

1.3.2 Mitose

Auch die Mitose von Pflanzenzellen kann in mehrere Phasen aufgeteilt werden und wird im Folgenden genauer beschrieben. Die einzelnen Phasen werden jedoch nur zur Charakterisierung der Mitose genutzt, die Mitose selbst verläuft normalerweise ohne Stopps. Nach der Interphase (G_1-Phase bis G_2-Phase des Zellzyklus; Abb. 1.6 a) geht die Zelle in die Prophase der Mitose über (Abb. 1.6 b + c). Die Schwesterchromatiden der Chromosomen werden durch fortlaufende Kondensation stark verkürzt. Gleichzeitig wird mit dem Aufbau des Spindelapparats an den Polkappen (= Mikrotubuli-organisierende Zentren) begonnen. Dieser besteht aus vielen Mikrotubuli-Untereinheiten. Hierbei werden Kinetochor- und Polmikrotubuli unterschieden. Die Kinetochormikrotubuli sind am einen Ende mit den Zellpolen und am anderen Ende mit den Kinetochoren der Chromosomen (jede Chromatide besitzt ein Kinetochor) verbunden. Die Polmikrotubuli dagegen sind am einen Ende mit einem Pol verbunden und das andere Ende ragt in die sogenannte Äquatorialebene. Die Kernhülle wird langsam aufgelöst. Das Ende der Prophase bzw. die Prometaphase (Abb. 1.6 d) ist erreicht, wenn die Kernhülle komplett aufgelöst ist. In der Metaphase (Abb. 1.6 e) ist der Spindelapparat vollständig ausgebildet und die Chromosomen in der Äquatorialebene angeordnet. Darauffolgend werden die Schwesterchromatiden in der Anaphase (Abb. 1.6 f) endgültig voneinander getrennt und durch das Zusammenspiel von

Kinetochor- und Polmikrotubuli an die entgegengesetzten Pole der Zelle transportiert. In der Telophase (Abb. 1.6 g + h) haben die Chromatiden, bzw. Tochterchromosomen die Zellpole erreicht, der Spindelapparat wird aufgelöst. Außerdem beginnen die Chromosomen sich zu dekondensieren und eine neue Kernhülle wird gebildet. Die Mikrotubuli bilden nun an der Äquatorialebene den Phragmoplasten und es entsteht durch das Anlagern und Verschmelzen von Golgi-Vesikeln die Zellplatte. Ist die Zellplatte vollständig ausgebildet, ist die Mitose abgeschlossen und die Tochterzellen gehen in die Interphase über (Abb. 1.5 i) (Baskin & Cande, 1990; Nultsch, 2001; Lüttge *et al.*, 2010).

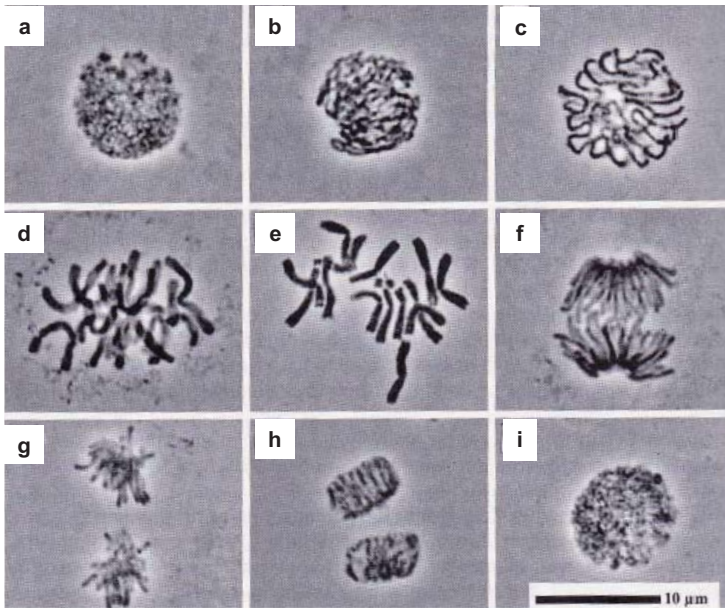

Abbildung 1.6 Ablauf der Mitose bei Pflanzen
(am Beispiel von Roggen = lichtmikroskopische Aufnahmen, aus Nultsch, 2001)
a Interphase; b + c Prophase; d Prometaphase; e Metaphase; f Anaphase; g + h Telophase; i Interphase

1.4 Doppelhaploidentechnik

Als Haploide bezeichnet man Pflanzen, die die Chromosomenzahl von Gametophyten aufweisen. Es handelt sich um autonome Pflanzen, die aus einer Gametenzelle entstanden sind. Haploide, welche aus diploiden Pflanzen entstanden sind, bezeichnet man auch als Monoploide. Bei haploiden Pflanzen bilden sich jedoch aufgrund der Tatsache, dass keine „normale“ Meiose stattfinden kann, keine Sporen. Somit sind haploide Pflanzen meist steril (Hess, 1992; Khush & Virmani, 1996). Zum Einsatz der Pflanzen in der Züchtung müssen aus den Haploiden daher durch Verdopplung des Chromosomensatzes fertile Doppelhaploide hergestellt werden.

1.4.1 Kurze Geschichte der Doppelhaploidentechnik

Ein wichtiger Meilenstein in der Geschichte der DH-Technik war die Beobachtung der ersten natürlich auftretenden Haploiden bei *Datura stramonium* durch Belling und Blakeslee 1922. Darauffolgend wurde bei vielen Pflanzenspezies über das Auftreten von Haploiden berichtet

(Khush & Virmani, 1996). Die ersten haploiden Maispflanzen wurden durch Stadler und Randolph bereits im Jahre 1929 beobachtet (Randolph, 1932). Wichtige Pionierarbeit leisteten außerdem die Studien von Blakeslee und Avery durch den Einsatz von Colchicin die Induktion der Chromosomensatzverdopplung bei Pflanzen künstlich hervorzurufen (Blakeslee & Avery, 1937). Eine der ersten DH-Linien bei Mais konnte bereits 1952 durch die Injektion von Colchicin in das Epikotyl junger haploider Keimlinge erzeugt werden (Chase, 1952). Im Laufe des letzten Jahrhunderts wurden für verschiedene Pflanzenspezies viele Methoden zur künstlichen Erzeugung Haploider und Doppelhaploider entwickelt, welche im folgenden Kapitel kurz allgemein und dann speziell für Mais geschildert werden.

1.4.2 Allgemeine Vorgehensweise

Zur Erzeugung Doppelhaploider eingesetzte Techniken lassen sich in zwei Schritte aufteilen: 1. Erzeugung von haploidem Gewebe, oder haploiden Pflanzen (1n) aus heterozygoten Eltern; 2. Aufregulierung der Chromosomensätze im haploiden Gewebe, bzw. der haploiden Pflanzen, um doppelhaploide Pflanzen (2n) zu erhalten (Baenziger, 1996).

Bei den meisten Pflanzenarten ist die Frequenz spontan auftretender Haploider relativ gering. Jedoch gibt es verschiedene Protokolle, um Haploide gezielt zu erzeugen. Diese Protokolle lassen sich in *in-vitro*- und *in-vivo*-Techniken unterteilen. Bei der *in-vitro*-Technik können entweder über Androgenese oder Gynogenese Haploide erzeugt werden. Androgenese erfolgt durch die Kultur von Antheren oder isolierten Mikrosporen. Diese Technik kommt aufgrund der relativ einfachen Handhabung bei vielen Pflanzenspezies zum Einsatz. Jedoch sind die Möglichkeiten zur Herstellung ausreichend großer Zahlen Haploider zum Einsatz in der Züchtung bis auf einige Ausnahmen begrenzt. Desweiteren gibt es hier starke genotypische Unterschiede innerhalb einer Pflanzenspezies. Bei der Gynogenese werden Zellen aus dem weiblichen Gametophyten (ähnlich der Parthenogenese) zur Embryoentwicklung stimuliert. Diese Technik findet z. B. bei *Allium cepa* L. und *Beta vulgaris* L. Anwendung. Jedoch wird Gynogenese aufgrund relativ geringer Effizienz eher selten zur Produktion von Haploiden verwendet. Bei der *in-vivo*-Technik kommt es aufgrund von interspezifischen oder intergeneren Kreuzungen zur Chromosomeneliminierung bzw. Parthenogenese. Ein gutes Beispiel für interspezifische Hybridisierung ist das sogenannte *Bulbosum*-System bei Gerste. Nach Bestäubung von *Hordeum vulgare* L. mit *Hordeum bulbosum* L. findet zwar eine Befruchtung statt, aber (meist) die *Bulbosum*-Chromosomen werden früh in der Embryonalentwicklung eliminiert. Die nur bedingt lebensfähigen Embryonen werden dann *in vitro* über die „embryo rescue"-Technik zu haploiden Pflanzen kultiviert. Ein Beispiel für intergenerische Hybridisierung ist die Bestäubung von Weizen mit Maispollen. Hier kommt es ebenso zur Eliminierung der Maischromosomen und haploide Pflanzen können über embryo rescue herangezogen werden (Khush & Virmani, 1996; Kasha, 2005; Forster *et al.*, 2007; Dunwell, 2010).

Bei der Erzeugung von Doppelhaploiden findet, nachdem in den haploiden Zellen während der S-Phase alle Chromosomen verdoppelt wurden, keine Zellteilung statt. Somit entstehen Zellen mit jeweils zwei identischen Chromosomensätzen. Dies kann entweder spontan durch Vorgänge wie Endomitose, Endoreduplikation oder Kernfusion auftreten, oder durch

künstliche Induktion hervorgerufen werden. Bei den meisten Pflanzen, ebenso bei Mais, ist wie bei der Entstehung Haploider auch das Auftreten von spontaner Verdopplung des Chromosomensatzes relativ gering, bzw. auch stark vom jeweiligen Genotyp abhängig. Daher werden zur Produktion fertiler DH-Pflanzen Techniken zur künstlichen Aufregulierung des Chromosomensatzes benötigt. In der Literatur zur Erzeugung von DH-Pflanzen findet man verschiedene Möglichkeiten zur Verdopplung von Chromosomensätzen mittels Chemikalien, oder auch durch Anwendung physikalischer Verfahren. Die eingesetzte Methode ist dabei jeweils auch von der Technik der Haploiden-Erzeugung abhängig. Bei der *in-vitro*-Kultur von Antheren oder Mikrosporen kann die Behandlung bereits nach der ersten mitotischen Teilung des Pollenkorns erfolgen. Bei der *in-vitro*-Kultur von Eizellen, bzw. embryo rescue oder auch bei der *in-vivo*-Haploideninduktion ist dagegen der Embryo der frühest mögliche Behandlungszeitpunkt. Die Behandlung *in vivo* ermöglicht viele Optionen, wie z. B. die Behandlung von Saatgut, Wurzeln, Keimlingen, oder Pflanzen. Die meisten Methoden, sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* verwenden jedoch Colchicin als Mitosehemmer (Kasha, 2005; Segui-Simarro & Nuez, 2008).

1.4.3 Erzeugung doppelhaploider Maispflanzen

1.4.3.1 Haploideninduktion

Die meisten Mais-Genotypen zeigen in der Gewebekultur nur eine geringe Regenerationsfähigkeit. Daher spielt bei Mais vor allem die *in-vivo*-Haploideninduktion eine Rolle (Geiger, 2009). Auch hier gibt es theoretisch zwei Möglichkeiten zur Erstellung Haploider: Zum einen die Erzeugung von paternalen Haploiden mittels der 1969 entdeckten ig (indeterminate gametophyte)-Mutation (Kermicle, 1969) und zum anderen die Induktion von maternalen Haploiden (Birchler, 1994). In der Maiszüchtung wird hauptsächlich die Technik zur Induktion maternaler Haploide eingesetzt. Diese Technik wurde vor allem durch die Entdeckung der ersten Inducer-Linie, Stock6, (Coe & Sarkar, 1964) ermöglicht und in den letzten Jahrzehnten immer weiter entwickelt. Wie in Abbildung 1.7 dargestellt, werden hierbei Kolben der Genomdonor-Pflanzen mit Pollen einer Inducer-Linie bestäubt. Über einen Mechanismus, der noch nicht genau aufgeklärt ist, entstehen hierbei zwischen 1-10 % haploide Körner (Röber, 1999).

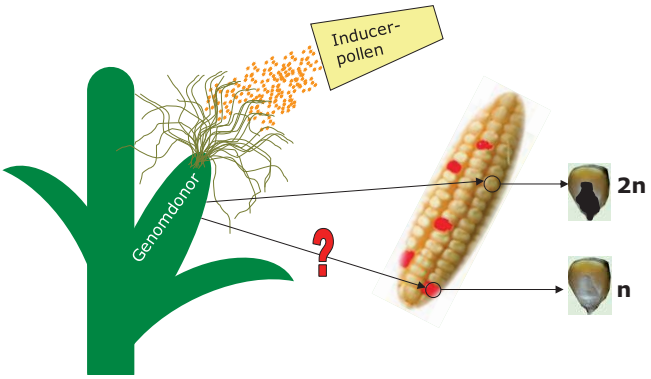

Abbildung 1.7 Vorgehensweise zur Induktion von maternalen Haploiden

Die meisten der heutzutage eingesetzten Inducer-Linien leiten sich von Stock6 ab (Eder & Chalyk, 2003). Laut Literatur ist derzeit die Inducer-Linie RWS die effektivste. Diese entstand aus einer Kreuzung der russischen Linie KEMS und der französischen Linie WS14 und erreicht eine durchschnittliche Induktionsrate von 8 % (Lasherme & Beckert, 1988; Shatskaya *et al.*, 1994; Röber *et al.*, 2005).

Bevor die Haploiden zur Züchtung eingesetzt werden können, müssen diese zunächst selektiert werden. Neben den typischen Merkmalen haploider Pflanzen, wie z. B. der verringerte Wuchs gibt es jedoch noch zuverlässigere Methoden. Dies kann über verschiedene Mechanismen entweder über Korn-, oder Keimlings-Marker erfolgen, welche bei Mais am besten entwickelt sind (Dunwell, 2010). Der wohl am effektivsten wirkende Marker ist hier der „purple-embryo“ Korn-Marker (Nanda & Chase, 1966). Um diesen Marker einsetzen zu können, muss die Inducer-Linie homozygot für das *R1-nj*-Gen sein (Familie von Transkriptionsfaktoren, die die Expression des Anthocyanin-Pigments steuern; Li *et al.*, 2001). Der Genomdonor (d. h. die bestäubte Pflanze) dagegen muss farbloses Saatgut produzieren. Haploides Saatgut zeigt ein gefärbtes Endosperm (immer triploid) und einen farblosen Embryo. Erhält man Saatgut mit sowohl gefärbtem Endosperm, als auch gefärbtem Embryo (*R1-nj* ist dominant), ist es diploid und Resultat einer normalen Entwicklung einer befruchteten Zygote (Geiger, 2009).

1.4.3.2 Aufregulierung des Chromosomensatzes

Da bei Mais vor allem die *in-vivo*-Haploideninduktion eingesetzt wird und desweiteren die *in-vitro*-Kultur bei Mais relativ kompliziert ist, werden im Folgenden nur *in-vivo*-Systeme behandelt. Wie zuvor erwähnt wird bei den meisten Techniken Colchicin zur Aufregulierung der Chromosomensätze eingesetzt. Daher soll das Alkaloid im Folgenden noch einmal genauer betrachtet werden.

Colchicin

Colchicin ist ein Alkaloid der Herbstzeitlosen *Colchicum autumnale* L., das aber auch in anderen Pflanzen der *Liliaceae*-Familie vorkommt. In der Zytologie zur Beobachtung von Chromosomen hat der Einsatz von Colchicin zu einem deutlichen Fortschritt geführt (Dustin, 1978). Relativ früh wurde Colchicin auch in Studien zur Erhöhung des Ploidiegrades in Pflanzen eingesetzt (Blakeslee & Avery, 1937; Eigsti, 1938). Colchicin verhindert den Aufbau des Spindelapparats durch Depolymerisation der Mikrotubuli (Bindung an Tubulin), was zur Verhinderung der Zellteilung und zu sogenannten C-Mitosen führt (Levan, 1938). Nach der Regeneration der Zellen weisen diese den doppelten Chromosomensatz auf.

In den letzten Jahrzehnten wurde der Einsatz von Colchicin in der Mais DH-Technik als Standardmethode etabliert. Es ist jedoch bekannt, dass Colchicin spezifisch an den Spindelapparat von Säugetierzellen bindet. Aufgrund der geringeren Affinität zu Pflanzenspindeln ist hier im Gegensatz zu Säugern eine bis zu 1000fach höhere Konzentrationen zur Depolymerisierung der Mikrotubuli nötig (Bajer & Molè-Bajer, 1986; Morejohn *et al.*, 1987; Caperta *et al.*, 2006). Aufgrund dessen werden zur Erzeugung von Doppelhaploiden große

Mengen an Colchicin eingesetzt. Dies führt zu einer enormen Kostensteigerung und vor allem zu einer erhöhten Gefahr für den Anwender.

Alternativen zu Colchicin

Es sind viele Chemikalien bekannt, die in Pflanzenzellen zu einer Hemmung der Mitose führen können, so agieren z. B. ein Viertel aller Herbizide als Mitosehemmer (Dustin, 1978; Sharma, 1990; Breviario & Nick, 2000; Nick, 2000). Einige dieser Chemikalien zeigten sich vor allem in der Gewebekultur auch bei Mais als relativ effektiv bezüglich der Aufregulierung von Chromosomensätzen (Hansen *et al.*, 1998; Wan *et al.*, 1991). Doch auch die depolymerisierende Wirkung von extremen physikalischen Reizen auf die Mikrotubuli-Organisation von Pflanzenzellen ist bekannt (Nick, 2000) . Relativ früh wurden Experimente z. B. mit Temperaturextremen durchgeführt, aber auch der Einsatz von Lachgas führte zu einer Chromosomensatz-Verdopplung in haploiden, sowie diploiden Maiszellen (Randolph, 1932; Chu *et al.*, 1992; Kato, 2002; Kato & Birchler, 2006).

1.5 Ziel dieser Arbeit

Betrachtet man die aktuelle Literatur, so lässt sich erkennen, dass die Doppelhaploiden-technik in der Mais-Hybridzüchtung bereits in vielen Ländern als Standardmethode etabliert werden konnte. Jedoch weist die Technik immer noch ein deutliches Optimierungspotential auf, wenn man z. B. die Gesamtausbeute von insgesamt ca. 1 % (jeweils 10 % Ausbeute an Haploiden, bzw. Doppelhaploiden) in einem Standard-Zuchtprogramm betrachtet (persönliche Mitteilung, Monguzzi, F., 2010). Die Verbesserung der Haploideninduktion und der Aufdopplungseffizienz könnte somit zur Optimierung der Methodik beitragen. Neben der Effizienzsteigerung könnten jedoch auch die Kosten der DH-Entwicklung durch z. B. den Einsatz effektiverer Mitosehemmer gesenkt werden. Desweiteren ist die Verwendung der Technik vor allem durch den vorwiegenden Einsatz des Alkaloids Colchicin aufgrund der hohen Toxizität für den Anwender nicht immer wünschenswert. Aufgrund dessen und aufgrund der teilweise schlechten Infrastruktur bezüglich des Umgangs mit Gefahrstoffen kann die Methodik noch nicht in allen Ländern als Standard genutzt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Ermittlung und optimale Nutzung von effektiven und / oder vor allem mindergiftigen Colchicin-Alternativen für die DH-Technik bei Mais. Hierfür wurden folgende Haupt-Schritte durchgeführt:

- Beurteilung von möglichen bekannten Colchicin-Alternativen aus dem Bereich der Chemikalien, sowie Entwicklung und Beurteilung von physikalischen Behandlungs-Methoden mittels eines geeigneten Test-Systems
- Bestimmung geeigneter Bedingungen und Optimierung der Behandlung von haploidem Pflanzenmaterial mit potenziellen Colchicin-Alternativen
- Hochdurchsatz-Screening einer Chemikalien-Bibliothek, um neue Colchicin-Alternativen zu identifizieren.